THESE de DOCTORAT D'ETAT

ès Sciences Naturelles

présentée

à l'Université Pierre et Marie Curie

- Paris 6 -

par Jean-Noël PIERRE

pour obtenir le grade de DOCTEUR ès SCIENCES

Sujet de la thèse:

ETUDE DE LA GLYCOLYSE DANS LE *Kalanchoe blossfeldiana*: CONTROLE PAR LA PHOTOPERIODE, RYTHMICITE ET REGULATION EN RELATION AVEC LE METABOLISME ACIDE DES CRASSULACEES

soutenue le 18 septembre 1981

devant le jury composé de:

M.M. P. CHAMPAGNAT
D.D. DAVIES
P. GADAL
J. GUERN
C. LANCE
O. QUEIROZ

THESE de DOCTORAT D'ETAT

ès Sciences Naturelles

présentée

à l'Université Pierre et Marie Curie

- Paris 6 -

par Jean-Noël PIERRE

pour obtenir le grade de DOCTEUR ès SCIENCES

Sujet de la thèse:

ETUDE DE LA GLYCOLYSE DANS LE Kalanchoe blossfeldiana: CONTROLE PAR LA PHOTOPERIODE, RYTHMICITE ET REGULATION EN RELATION AVEC LE METABOLISME ACIDE DES CRASSULACEES

soutenue le 18 septembre 1981

devant le jury composé de:

M.M. P. CHAMPAGNAT
D.D. DAVIES
P. GADAL
J. GUERN
C. LANCE
O. QUEIROZ

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

- J'exprime ma profonde gratitude à MM. CHAMPAGNAT, DAVIES, GADAL, GUERN, LANCE qui ont bien voulu accepter de juger ce travail.

- Que Monsieur QUEIROZ trouve ici l'expression de ma reconnaissance pour m'avoir accueilli dans son équipe et dirigé dans mon travail.

- Ma profonde sympathie à mes amis du laboratoire.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547321_0038

SOMMAIRE

Pages

ABREVIATIONS et DEFINITIONS 1

INTRODUCTION 4

MATERIEL et METHODES 8

A. Matériel

B. Méthodes expérimentales

C. Méthodes de calcul

PREMIERE PARTIE

LE CONTROLE DE LA GLYCOLYSE PAR LA PHOTOPERIODE

I. COORDINATION DU FONCTIONNEMENT DU RESEAU METABOLIQUE APRES UN CHANGEMENT DE PHOTOPERIODE 16

A. COORDINATION AU NIVEAU DES CAPACITES ENZYMATIQUES 16

1. Description des évènements 16

a. Variation de capacité des enzymes de la voie CAM

α. Variation de la rythmicité circadienne

β. Variation des niveaux de capacité enzymatique

b. Variation de capacité des enzymes de la glycolyse

α. Variation de la rythmicité circadienne

β. Variation des niveaux de capacité enzymatique

2. Coordination du fonctionnement suivant une loi d'allométrie ... 18

a. Allométrie entre les enzymes de la voie CAM

b. Allométrie entre les enzymes de la glycolyse et la PEPC

3. Notion de groupes d'enzymes. Blocs fonctionnels 19

4. Coordination dans la composition isozymique de la glycolyse et de la voie CAM 20

a. Les isozymes de la voie CAM

b. Les isozymes de la glycolyse

Pages

B. COORDINATION AU NIVEAU DES POOLS D'INTERMEDIAIRES 23

1. Variation de la rythmicité circadienne
2. Variation de la taille des pools avec la photopériode

C. DISCUSSION 24

1. Modalités métaboliques
2. Les constantes de temps

II. LA MESURE DU TEMPS ASSURE LA COORDINATION DU RESEAU METABOLIQUE .. 28

A. ROLE DU SIGNAL "JOUR/NUIT" 28

1. Heure du pic de capacité relativement au signal jour/nuit selon le régime photopériodique
2. Modification de la capacité enzymatique avant et après le signal "jour/nuit"
3. Réponse à une modification de la position du signal "jour/nuit": l'entraînement du rythme endogène

B. DISCUSSION 33

DEUXIEME PARTIE

LA REGULATION DE LA GLYCOLYSE SELON LE NIVEAU CAM

I. LES MODELES ACTUELS 36

A. LE MODELE DE REGULATION ALLOSTERIQUE DE COCKBURN ET MAC AULAY ... 36

1. Description du modèle
2. L'application du modèle à nos résultats obtenus en régime de CAM élevé chez *Kalanchoe blossfeldiana*

B. EXTENSION OU MODELE DE REGULATION ALLOSTERIQUE A PARTIR DE NOS RESULTATS 37

Pages

1. Situation aux 26ème et 40ème Jours Courts, période nocturne
2. Situation en Jour Long et au 12ème Jour Court, période nocturne
3. Situation en Jours Longs et en Jours Courts, pendant le jour..

C. LES LIMITES DU MODELE DE REGULATION ALLOSTERIQUE 39

1. Le rôle du CO_2
2. Le rôle du malate

D. ELABORATION D'UN MODELE COMBINANT REGULATION ALLOSTERIQUE ET VARIATIONS JOURNALIERES DE CAPACITE ENZYMATIQUE 41

E. CONCLUSIONS 43

II. ROLE PHYSIOLOGIQUE DE L'EXCES DE CAPACITE ENZYMATIQUE 44

A. CONSIDERATIONS GENERALES 44

B. L'EXCES DE CAPACITE ENZYMATIQUE ET L'AUGMENTATION DU FLUX CARBONE AVEC LE NOMBRE DE JOURS COURTS 45

C. L'EXCES DE CAPACITE ENZYMATIQUE ET LA REGULATION JOURNALIERE DU FLUX CARBONE 46

CONCLUSIONS GENERALES 49

BIBLIOGRAPHIE 52

FIGURES, SCHEMAS ET TABLEAUX

ABREVIATIONS et DEFINITIONS

ABREVIATIONS

Métabolites

AOA	oxaloacétate
ATP	adénosine-triphosphate
F-6-P	fructose-6-phosphate
F-1,6-biP	fructose-1,6-biphosphate
G-3-P	glyceraldehyde-3-Phosphate
G-6-P	glucose-6-phosphate
GSH	glutathion réduit
NAD	nicotinamide adénine dinucléotide
NADH	nicotinamide adénine dinucléotide réduit
NADP	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
$MgCl_2$	chlorure de magnésium
PEP	phosphoénol pyruvate
3-PGA	3-phosphoglycérate
2-PGA	2-phosphoglycérate
T.P.	trioses phosphates

Enzymes

EM	malate déshydrogénase (NADP) décarboxylative, anciennement enzyme malique, E.C. 1.1.1.40
G-3-PDH	3-phosphoglycéraldéhyde déshydrogénase (NAD), E.C. 1.2.1.12
G-6-PDH	glucose-6-phosphate déshydrogénase, E.C. 1.1.1.49
GDH	glycérol phosphate déshydrogénase, E.C. 1.1.1.8
MDH	malate déshydrogénase, E.C. 1.1.1.37
PAL	phénylalanine ammoniac lyase, E.C. 4.3.1.5
p.c.: coA ligase	paracoumarate : coA ligase, E.C. 6.2.1.-.

PEPC	phosphoénol pyruvate carboxylase, E.C. 4.1.1.31
PFK	phosphofructokinase, E.C. 2.7.1.11
PGK	phosphoglycérate kinase E.C. 2.7.2.3
PGM	phosphoglycéromutase, E.C. 5.4.2.1
TPI	triose phosphate isomérase E.C. 5.3.1.1.

Autres

JL	Jours Longs
JC	Jours Courts
MS	matière sèche
MF	matière fraîche
heures	par convention 20h30 min, par exemple, s'écrit 2030

DEFINITIONS

CAM

"Crassulacean Acid Metabolism" . Une plante est à métabolisme CAM si elle montre les critères suivants (KLUGE et TING, 1978) :

- le contenu en acide malique oscille au cours de la journée avec une accumulation nocturne .
- le contenu en hydrate de carbone doit osciller en opposition de phase avec l'acide malique .
- la fixation de CO_2 est surtout nocturne .
- le rythme d'ouverture des stomates est inverse de celui des plantes non CAM.

Capacité enzymatique

Activité maximum d'une enzyme obtenue, a un stade physiologique donné, par extraction totale de l'enzyme et mesurée dans des conditions non limitantes de substrats et cofacteurs.

Glucanes

Selon la définition de SUTTON (1975a), les glucanes sont tous les polymères de glucose autres que l'amidon et sont composés de 6 à 36 unités de glucose. L'amidon et les glucanes sont solubles dans l'acide perchlorique mais seul l'amidon est précipité par l'iodine.

Rythmes circadiens

Un phénomène rythmique circadien endogène doit répondre aux caractéristiques suivantes (PITTENDRIGH, 1954) :

- le rythme persiste en libre cours, c'est-à-dire en absence de tout stimulus externe.
- la période (τ) est proche de 24 heures en libre cours.
- la période est indépendante de la température ($Q_{10} \simeq 1$).
- le rythme peut être déphasé (avance ou retard) par un signal externe et il persiste à nouveau en libre cours.
- l'entraînement (couplage entre le rythme endogène et le rythme externe) impose au rythme endogène la période du rythme externe ($T = 24$ heures). Le couplage n'a lieu que pour un intervalle de fréquences spécifiques.

INTRODUCTION

Parmi les plantes présentant un métabolisme de type CAM, le *Kalanchoe blossfeldiana* cultivar Tom Thumb est considéré comme une plante "CAM facultative" (OSMOND, 1976) où l'expression du métabolisme CAM est déclenchée par le changement d'une des composantes du milieu extérieur, la photopériode. En Jours Longs, dans les jeunes feuilles, la capacité de fixation nocturne de CO_2 (GREGORY et coll., 1954), l'accumulation nocturne de malate (QUEIROZ, 1965), le niveau de fonctionnement de la PEPC (QUEIROZ, 1968), la teneur en ^{13}C (LERMAN et QUEIROZ, 1974 ; DELEENS et coll., 1979) sont faibles ; ceci étant caractéristique des plantes à métabolisme en C_3. Après le changement de photopériode (Jours Courts) on observe une augmentation :

- de la fixation nocturne du CO_2 (GREGORY et coll., 1954 ; QUEIROZ, 1970)
- de l'accumulation nocturne du malate (QUEIROZ, 1966)
- du niveau de fonctionnement de la PEPC (MOREL et coll., 1972)
- de la teneur en ^{13}C (OSMOND et coll., 1973 ; LERMAN et QUEIROZ, 1974 ; DELEENS et coll., 1979).

Cette réponse au passage en Jours Courts a lieu après une période de latence, qui présente les caractéristiques de l'induction photopériodique (BRULFERT et coll., 1975).

Mais le *Kalanchoe blossfeldiana* pourrait également être considéré comme une plante "CAM constitutive" selon la définition d'OSMOND (1976) si l'on considère que cette plante possède tout l'équipement enzymatique nécessaire à l'exécution du programme CAM, et que le changement de photopériode ne provoque, au niveau des jeunes feuilles qu'une simple accélération d'un processus de développement normal chez les feuilles plus âgées de la plante. Ceci a été montré par l'augmentation du niveau de fonctionnement de la PEPC et l'accumulation nocturne de malate (BRULFERT et coll., 1976) et l'augmentation de la teneur en ^{13}C (DELEENS, 1980) suivant le rang des feuilles, en régime photopériodique de Jours Longs.

Donc le classement, un peut hâtif, du *Kalanchoe blossfeldiana* dans les plantes "CAM facultatives" provenait d'une synthèse et d'une interprétation insuffisantes des données disponibles et nous préférerons utiliser le terme de plantes "CAM saisonnières" pour toute plante dont le métabolisme passe d'une

photosynthèse de type C_3 dominante à une photosynthèse de type CAM dominante selon la saison, la modification du paramètre de l'environnement pouvant être la photopériode (*Kalanchoe blossfeldiana*), l'hydropériode (*Mesembryanthemum crystallinum* : WINTER et coll., 1978) et conserver le terme de plante "CAM constitutive ou obligatoire" pour toute plante dont le métabolisme est essentiellement CAM quelle que soit la saison, les modifications des paramètres de l'environnement modulant simplement l'expression de ce métabolisme : température (voir les revues de WOLF, 1960 et RANSON et THOMAS, 1960), photopériode (*Kalanchoe daigremontiana* : MARCELLE , 1975 ; *Aloe vera* : CREWS et coll., 1976) hydropériode (*Opuntia basilaris* : SZAREK et TING, 1974a).

Parallèlement aux travaux (BANDURSKI et GREINER, 1953 ; WALKER, 1956, 1957 ; RANSON et THOMAS, 1960 ; TING, 1971) qui ont conduit à l'établissement du schéma de fonctionnement temporel de la voie CAM (schéma 1) un certain nombre d'auteurs se sont intéressés à l'origine du PEP, substrat de la carboxylation nocturne.

VICKERY (1952, 1954) a le premier établi que les courbes de variations journalières d'amidon et de malate étaient en opposition de phase : durant la nuit, alors que l'amidon et les glucanes sont consommés, le malate s'accumule. KLUGE et coll. (1975) ont montré que le malate est synthétisé pendant la nuit à partir des chaînons carbonés provenant des polysaccharides fabriqués par la photosynthèse pendant le jour précédent.

Durant la période nocturne du cycle de 24 heures, les deux voies métaboliques susceptibles de fournir le PEP sont la glycolyse et la voie des Pentoses Phosphates. BEEVERS et GIBBS (1954) ont mis en évidence un possible écoulement du flux carboné par la voie des Pentoses Phosphates chez *Bryophyllum* (aucune précision sur les conditions de culture et sur l'heure de l'expérimentation n'est donnée par les auteurs); COCKBURN et MAC AULAY (1977) montrent que les niveaux des pools de PEP et des intermédiaires de la glycolyse s'accroissent lorsque l'on passe le *Kalanchoe daigremontiana*, placé à la lumière dans une atmosphère normale, à l'obscurité dans une atmosphère sans CO_2 (le PEP n'étant pas utilisé pour la carboxylation, les substrats en amont s'accumulent). Ce résultat tend à montrer, durant la période nocturne, une possible origine du PEP à partir de l'amidon et des polysaccharides à travers la voie de la glycolyse.

SUTTON (1975b) est le premier à aborder, dans ces plantes, l'étude de la glycolyse au niveau enzymatique en comparant les niveaux de capacité des différentes enzymes de la glycolyse durant la phase de fixation nocturne de CO_2 ; il montre que les capacités mesurées sont suffisantes pour expliquer

la quantité de malate synthétisé par heure. A ces premiers résultats sur le rôle fonctionnel de la glycolyse durant la période nocturne s'ajoutent les travaux de COCKBURN et MAC AULAY (1977) sur les variations de la taille des pools d'intermédiaires de cette même voie, pendant la phase d'acidification nocturne.

Durant la période diurne du cycle de 24 heures le PEP est supposé être le précurseur de synthèse des polysaccharides et glucanes par la gluconéogenèse (HAIDRI, 1955 ; MILBURN et coll., 1968). Cette hypothèse est appuyée par la mise en évidence chez certaines plantes succulentes d'une pyruvate-Pi-dikinase permettant la conversion pyruvate → PEP (KLUGE et OSMOND, 1971 ; SUGIYAMA et LAETSCH, 1975) et de l'existence de certaines enzymes (phosphorylase, glucose phosphate isomérase, triose phosphate isomérase, phosphoglycérate kinase) fonctionnant dans le sens de la gluconéogenèse chez *Kalanchoe daigremontiana* (SUTTON, 1975b).

L'hypothèse de l'origine du PEP à travers le fonctionnement de la voie de la glycolyse semblant actuellement généralement admise, les questions clés qui restent posées portent sur :

- l'organisation temporelle du fonctionnement de cette voie en relation avec celle de la voie CAM,
- les mécanismes de contrôle et de régulation qui permettent une accumulation nocturne de malate.

Dès mon arrivée au Phytotron, Monsieur QUEIROZ m'a proposé une étude enzymatique et métabolique de la glycolyse chez *Kalanchoe blossfeldiana* dans le but de vérifier l'hypothèse selon laquelle le photopériodisme agirait sur la coordination du fonctionnement de l'ensemble des voies d'une partie du réseau métabolique plutôt qu'au niveau de la seule étape enzymatique occupant une position clé dans la voie CAM.

Etant donnée la compartimentation temporelle de fonctionnement de la voie CAM, l'étude se devait d'être menée sur des durées à la fois significatives de l'effet journalier et de l'effet saisonnier de la photopériode. L'hypothèse selon laquelle ce paramètre de l'environnement agissait comme coordonnateur de fonctionnement nécessitait qu'une claire distinction soit établie entre *contrôle* et *régulation*. Selon le schéma général proposé par LIBBERT (1976) (schéma 2a) il y a *contrôle*, lorsqu'une information extérieure à un système agit sur le flux de celui-ci ; il y a *régulation* si, au contrôle du flux dans le système par l'information extérieure, s'ajoute un contrôle par les produits du système. Une telle régulation tend à maintenir le flux à un niveau constant.

Pour KLUGE et TING (1978) le maintien du système CAM dépend plus des processus de *contrôle* que des processus de *régulation* ceux-ci n'intervenant que localement dans des séquences partielles des systèmes physiologiques (stomates) ou des systèmes métaboliques (rétroinhibition de la PEPC par le malate (fig.2b). Dans ce dernier cas, la régulation aurait pour but de contrôler le flux carboné à travers la PEPC et la MDH.

Si, dans l'optique d'une étude de l'effet journalier et saisonnier de la photopériode sur le réseau métabolique, nous appliquons ces schémas au cas du *Kalanchoe blossfeldiana*, il convient d'introduire plus explicitement la notion de rythmicité que l'on peut retrouver à tous les niveaux de l'organisation d'une plante CAM (tableau I), notion qui implique que l'on tienne compte de la notion de mesure du temps. Considérant, alors, les notions de capacité et d'activité enzymatiques et leurs relations telles que les décrit QUEIROZ (1976 , 1979a), il apparaît que les processus de *contrôle* et de *régulation* n'agissent pas soit de façon globale soit localement comme le suggèrent KLUGE et TING, mais interviennent de façon interconnectée : le rythme d'activité de la PEPC, par exemple, est déterminé, d'une part par le rythme de capacité *contrôlé* par la photopériode par l'intermédiaire du phytochrome, et peut être, d'autre part *régulé* par le rythme de malate (schéma 2 c).

Notre étude, tenant compte du temps local et du temps physiologique a pour but de souligner :

1°) l'importance de la distinction entre capacité et activité enzymatique pour une meilleure compréhension des mécanismes de contrôle et de régulation,

2°) la nécessité de tenir compte de la rythmicité circadienne des capacités et activités enzymatiques pour expliquer la coordination de fonctionnement du réseau métabolique.

L'ensemble des résultats devrait conduire à une mise en évidence du rôle adaptatif de ces différentes relations.

MATERIEL et METHODES

A. MATERIEL

Les boutures de *Kalanchoe blossfeldiana* cultivar Tom Thumb proviennent d'un clone et sont cultivées en JL (16 heures de lumière, de 08h45 à 00h45, éclairage mixte fluorescence incandescence, environ 110 watt/m^2 au niveau des plantes). Après 8 semaines, les plantes sont placées en JC (8 heures de lumière de 08h45 à 17h45, même éclairage). La température, dans les deux cas, est de 27°C de 08h45 à 17h45 et de 17h45 à 08h45. Le passage de Jours Longs en Jours Courts fait donc intervenir le seul photopériodisme, la thermopériode restant la même. L'humidité relative est, dans les deux cas, de 70 %.

Les prélèvements sont constitués par les jeunes feuilles de rang 2, à compter de l'apex, d'après les critères précédemment décrits (QUEIROZ, 1968).

B. METHODES EXPERIMENTALES

1°) Mesure des capacités enzymatiques

a) Extraction

La quantité de matériel lyophilisé utilisé pour les extractions dépend du traitement photopériodique (33 mg en JL, 16 mg en JC). Les fragments de feuilles lyophilisées sont rapidement broyés à 4°C dans un tampon phosphate 0,2 M (environ 6 ml), pH 7,8 avec par ml, 3 µmoles de $MgCl_2$, 15 µmoles de GSH et une quantité équivalente au poids de matériel lyophilisé de polyéthylène glycol (PM : 20 000). L'extrait est centrifugé à 120 000 g pendant 25 mn, le surnageant est utilisé pour les mesures de capacité enzymatique.

b) Milieux réactionnels

Les variations de capacités enzymatiques sont mesurées au spectrophomètre, à 30°C, par des cinétiques linéaires, d'une durée minimum de vingt minutes, de l'absorption à 340 nm du NADH ou du NADP, ou dans le cas de l'énolase et de la phosphoglycérate mutase, par la formation de PEP à 240 nm.

Pour un volume final de 3 ml, les milieux ont la composition suivante en µmoles :

Phosphofructokinase (PFK) : tampon phosphate 0,02 M, pH 7,5 ; $MgCl_2$, 6 ; GSH, 20 ; NADH, 0,4 ; GDH-TPI et aldolase, en excès ; F-6-P, 18 à 30 ; ATP, 4 à 5 ; extrait enzymatique, 1 mg (JL), 0,42 mg ($12^{ème}$ JC), 0,25 mg ($26^{ème}$ JC), 0,11 mg ($40^{ème}$ JC), pH final, 7,3.

Aldolase : tampon phosphate 0,2 M, pH 7,9 ; $MgCl_2$, 7,5 ; NADH, 0,4 ; GDH-TPI en excès; F-1,6-biP, 25 à 40 ; extrait enzymatique, 0,2 mg (JL), 0,12 mg ($12^{ème}$ JC), 0,07 mg ($26^{ème}$ JC), 0,02 mg ($40^{ème}$ JC); pH final, 7,8.

Glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (G-3-PDH) : tampon phosphate 0,2 M, pH 7,9 ; GSH, 20 ; NAD, 9 ; G-3-P, 66 à 132 ; extrait enzymatique, 0,6 mg (JL), 0,12 mg ($12^{ème}$ JC), 0,0053 mg ($26^{ème}$ JC); pH final, 7,8. Une seule mesure a été faite au $40^{ème}$ JC,à 05h00.

Phosphoglycérate mutase (PGM) : tampon tris-HCl 0,2 M ; pH, 7,3 ; énolase, en excès ; 3-PGA, 15 à 40 ; extrait enzymatique, 0,20 mg (JL), 0,30 mg ($12^{ème}$ JC), 0,08 mg ($26^{ème}$ JC), 0,02 mg ($40^{ème}$ JC) ; pH final, 7,1.

Enolase : tampon tris-HCl 0,2 M; pH, 7,3 ; $MgCl_2$, 12 à 25 ; 2-PGA, 15 à 30 ; extrait enzymatique, 0,8 mg (JL), 0,9 mg ($12^{ème}$ JC), 0,5 mg ($26^{ème}$ JC), 0,2 mg ($40^{ème}$ JC) ; pH final, 7,1.

Phosphoénol pyruvate carboxylase (PEPC) : tampon phosphate 0,2 M, pH, 7,9 ; $MgCl_2$ 7,5 à 12 ; GSH, 20 ; NaF, 5 ; NADH, 0,4 ; PEP, 10 à 35 ; extrait enzymatique, 1,2 mg (JL) ; 0,3 mg ($12^{ème}$ JC), 0,13 mg ($26^{ème}$ JC), 0,07 mg ($40^{ème}$ JC) ; pH final, 7,8.

Glucose-6-phosphate déshydrogénase (G-6-PDH) : tampon phosphate 0,2 M, pH 7,9 ; $MgCl_2$, 8 ; NADP, 7 ; G-6-P, 60 ; extrait enzymatique, 1,2 mg (JL) 0,9 mg ($12^{ème}$ JC), 0,8 mg ($26^{ème}$ JC), 0,7 mg ($40^{ème}$ JC); pH final, 7,5.

c) Justification de l'utilisation de matériel lyophilisé

L'emploi du matériel lyophilisé nous a été imposé par la grille expérimentale que nous avons décidé de suivre. En effet, l'analyse du dernier prélèvement, après une série sur 24 heures n'aurait pu être effectuée, au mieux, 48 ou 72 heures après, ce qui posait le problème important de la conservation du matériel frais et de l'interprétation des résultats obtenus.

Nous avons vérifié sur 3 enzymes, l'effet de la lyophilisation sur la mesure des capacités enzymatiques en JL, au 35ème JC et au 56ème JC. Nous avons résumé, dans le tableau suivant, le pourcentage de perte (ou de gain) des mesures faites avec le matériel lyophilisé par rapport aux mesures obtenues à partir des extraits frais pour les prélèvements effectués aux heures indiquées.

	13h00	21h00	04h00	08h00	13h00	
JL	- 10%	- 14%	- 12%	- 23%	- 10%	PEPC
	- 16%	- 24%	- 20%	- 33%	- 16%	PFK
	- 10%	- 13%	- 11%	- 24%	- 10%	PGM

	13h00	17h00	23h00	07h00	13h00	
35e JC	+ 5%	- 6%	0%	- 30%	5%	PEPC
	- 3%	+ 5%	0%	- 40%	- 3%	PFK
	+ 6%	0%	- 1%	- 25%	+ 6%	PGM

	11h00	17h00	23h00	05h00	11h00	
56e JC	- 30%	- 27%	- 20%	- 97%	- 30%	PEPC
	- 26%	- 17%	- 32%	- 88%	- 26%	PFK
	0%	- 10%	- 2%	- 64%	0%	PGM

Il est à noter qu'aussi bien pour les extraits provenant de matériel frais que pour les extraits provenant de matériel lyophilisé, il n'y a aucune différence dans la valeur des capacités enzymatiques mesurées avant et après déssalage de l'extrait par passage sur colonne biogel de type P_{60} ou une Sephadex de type G_{25}.

Il ressort du tableau ci-dessus que l'on a :

- une perte relativement uniforme sur l'ensemble du cycle de 24 heures en JL,

---

la plus grande partie de ce travail a été effectué avec la collaboration technique de Claude CELATI à qui j'exprime ma profonde reconnaissance.

- au 35^{e} JC pratiquement pas de perte entre 13h00 et 23h00 mais la perte est plus importante entre 23h00 et 13h00

- au 56^{e} JC on perd jusqu'à 97 % de la capacité enzymatique au milieu de l'intervalle 23h00 - 11h00.

Il semble donc que l'effet de perte dû à la lyophilisation soit un effet indirect du régime photopériodique et du cumul du nombre de JC et que cet effet soit localisé dans une période du cycle de 24 heures sensiblement comprise entre 23h00 et 11h00 en Jours Courts.

Cet effet de perte dû à la lyophilisation a également été montré dans le *Kalanchoe daigremontiana* (BUCHANAN-BOLLIG et coll., 1980) . Ces auteurs affirment qu'il n'y a pas de rythme apparent de capacité de la PEPC dans le matériel frais. Pour cela, ils s'appuient sur deux courbes expérimentales : l'une comportant trois points expérimentaux sur le cycle de 24 heures, le troisième point redoublant le premier, ce qui, à notre avis, est insuffisant pour assurer qu'il n'y a pas de rythme ; l'autre courbe qui comporte sept points expérimentaux sur un intervalle de 30 heures d'expérimentation, présente le défaut de ne donner aucune valeur entre 2200 et 0800, intervalle de temps où la fixation du CO_2 par la PEPC est ls plus importante. Malgré cela, à l'aide du Cosinor, (voir méthodes de calcul) un rythme circadien serait décelable avec un degré de confiance de 91 % ; rythme, dont l'acrophase se situerait à 0422, justement, dans l'intervalle de temps où il n'y a pas de résultats expérimentaux.

Dans le *Kalanchoe daigremontiana*, l'effet de perte dû à la lyophilisation est plus important en fin de période nocturne (90 %) qu'en fin de période diurne dans les feuilles de rang 4, à compter de l'apex, où le niveau CAM est le plus élevé. Ceci confirme les résultats que nous avons trouvé dans *Kalanchoe blossfeldiana* dans les feuilles de rang 2 où, au 56ème JC, le niveau CAM est également maximum. Comme, dans le *Kalanchoe blossfeldiana*, l'importance de la perte de capacité enzymatique après lyophilisation semble corrélé avec le niveau de fonctionnement du CAM ; il faut être très circonspect quant à la généralisation de l'action de la lyophilisation dans les plantes CAM.

Deux points nous permettent de considérer que les résultats et leur interprétation présentés dans ce mémoire restent valables malgré l'emploi de la lyophilisation, le premier est que notre travail porte sur les 40 premiers JC, le second est que les principaux résultats reposent sur les relations de phases entre les maximum des rythmes des capacités des différentes enzymes, maximum qui se situent dans l'intervalle de temps où l'on a pratiquement pas d'effet de la lyophilisation.

2°) Mesure de la taille des pools

a) Extraction

150 mg de matériel lyophilisé sont broyés dans l'acide perchlorique 5 % (V/V) à 4°C en présence de 15 mg de polyclar AT (P.M. 4000). L'extrait est centrifugé pendant 2 min. à 60 000 g ; le surnageant est ajusté à pH 7,5 avec KOH 8 N. Le précipité de perchlorate de potassium est éliminé en centrifugeant 2 min. à 60 000 g. Les G-6-P, F-6-P, PEP et 2-PGA sont mesurés selon la méthode décrite par BERGMEYER (1965) et les T.P., F-1,6-biP et 3-PGA selon la méthode utilisée par COCKBURN et MAC AULAY (1977).

b) Justification de la lyophilisation

Les pourcentages retrouvés dans les extraits lyophilisés par rapport aux extraits frais pour un prélèvement fait le 30^{e} JC à 15h00 sont présentés dans le tableau suivant :

G-6-P	F-6-P	F-1,6-biP	T.P.	3-PGA	2-PGA	PEP	Pyr
102 %	95 %	96 %	94 %	97 %	94 %	100 %	100 %

3°) Séparation d'isozymes

Le matériel frais est rapidement broyé à 4°C dans un tampon Tris-HCl 0,2 M, pH 8,0 contenant par ml 3 µl moles de $MgCl_2$ et du polyéthylène glycol de PM 20,000 correspondant à 10 % du poids de matériel frais. L'extrait est centrifugé 30 mn à 120.000 g. Le surnageant est saturé à 35 % de sulfate d'ammonium pendant 4 heures à 4°C puis centrifugé, le nouveau surnageant est saturé à 65 % de sulfate d'ammonium pendant 12 heures à 4°C puis centrifugé. Le culot contenant toute l'enzyme étudiée est resuspendu dans un volume minimum (1,8 ml) de Tris-HCl 0,05 M, pH 8,0, contenant 10^{-3}M de $MgCl_2$ et 3 x 10^{-4}M de dithiotreitol. L'extrait est dessalé par passage sur une colonne de Biogel P_{60} équilibrée préalablement avec le même tampon. L'éluat est déposé sur une colonne DEAE-Sephacel pour l'étude de séparation des isozymes.

La colonne de DEAE-Sephacel (1,5 x 15 cm) est équilibrée a 4°C avec le même tampon Tris-HCl que pour le biogel P_{60} et elle est éluée, à 4°C, avec un gradient linéaire de Tris-HCl de 0,05 M à 0,5 M. Les fractions collectées ont un volume de 1 ml, le débit est de l'ordre de 22 ml/heure. Les milieux réactionnels pour les dosages enzymatiques sont ceux cités précédemment.

C. METHODES DE CALCUL

1°) Méthodologie pour l'étude des rythmes

Pour étudier les rythmes biologiques il est nécessaire de synchroniser les individus. Cela peut apparaître évident, mais il faut bien constater que la non-synchronisation rend *inutilisables* les résultats de nombreuses expériences (HALBERG et REINBERG, 1967). Ainsi prenons un exemple cité par les auteurs précédents : pour apprécier la variation circadienne moyenne des corticoïdes urinaires d'un groupe de sujet adultes et sains, respectant à peu près les mêmes horaires de travail et de repos (donc apparemment synchronisés) l'expérience montre qu'il est désirable de soumettre chacun des sujets à un mode de vie standardisé commun à tout le groupe et cela au moins depuis 8 jours.

Les schémas expérimentaux sont de trois types :

l'échantillon longitudinal : les résultats portent sur *1 sujet* pendant un espace de temps T beaucoup plus long que la période τ du rythme étudié ($T > 30\ \tau$).

l'échantillon transversal : les résultats portent sur un *groupe de sujets* aussi homogène que possible pendant un espace de temps relativement court ($T < 2\ \tau$). C'est le type d'échantillonnage que nous avons choisi.

l'échantillon hybride intéresse un nombre de sujet inférieur et une durée d'observation supérieure à ceux d'un échantillon transversal.

2°) Programme de calcul dit du Cosinor

a) Intérêt du programme

Le report des valeurs expérimentales laisse une grande imprécision sur les "minimum" et "maximum" d'une oscillation dans l'échelle de temps de la fonction étudiée par conséquence les relations de phase ou d'amplitude sont parfois difficiles à apprécier lorsque l'on a plusieurs fonctions. De plus la courbe expérimentale peut masquer la présence d'harmoniques de la fonction. Un avantage considérable de la méthode de calcul du Cosinor est qu'elle rend possible l'analyse de séries temporelles recueillies à des intervalles de temps inégaux ce qui permet de pratiquer des mesures sur des sujets sans le risque de leur apporter une information temporelle du fait de la régularité des mesures qui pourrait alors agir comme synchroniseur.

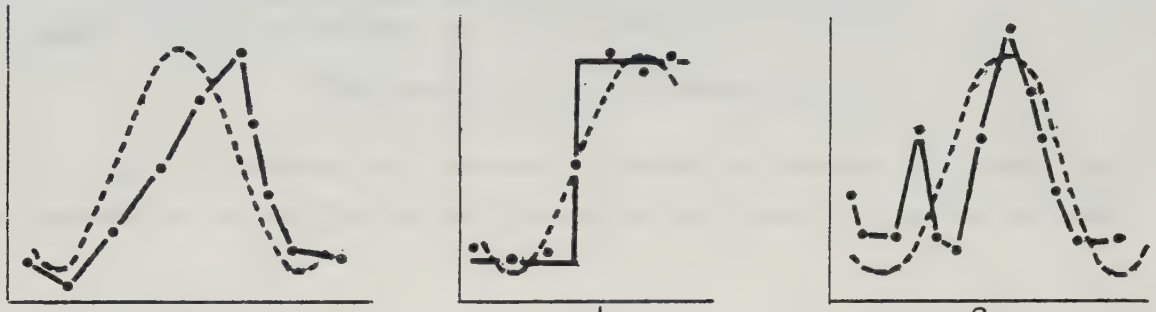
b) Principe du calcul

Ce programme de calcul mis au point par HALBERG et coll. (1967) repose sur l'analyse spectrale d'une fonction en lui appliquant la méthode des moindres carrés à l'aide de calculatrices électroniques. Ainsi pour une série temporelle figurée ci-dessous (a) les méthodes statistiques classiques indiqueront que les mesures s'alignent sur une droite figurée en pointillé

a b

dans (a) ; avec la méthode du Cosinor on montre qu'en fait, les points expérimentaux s'alignent sur une sinusoïde (b) dont on peut déterminer la fréquence, l'amplitude et la phase pour un degré de sécurité statistique de 95 % par exemple.

Cette méthode présente bien sur des inconvénients et nous ne citerons que trois exemples.



c d e

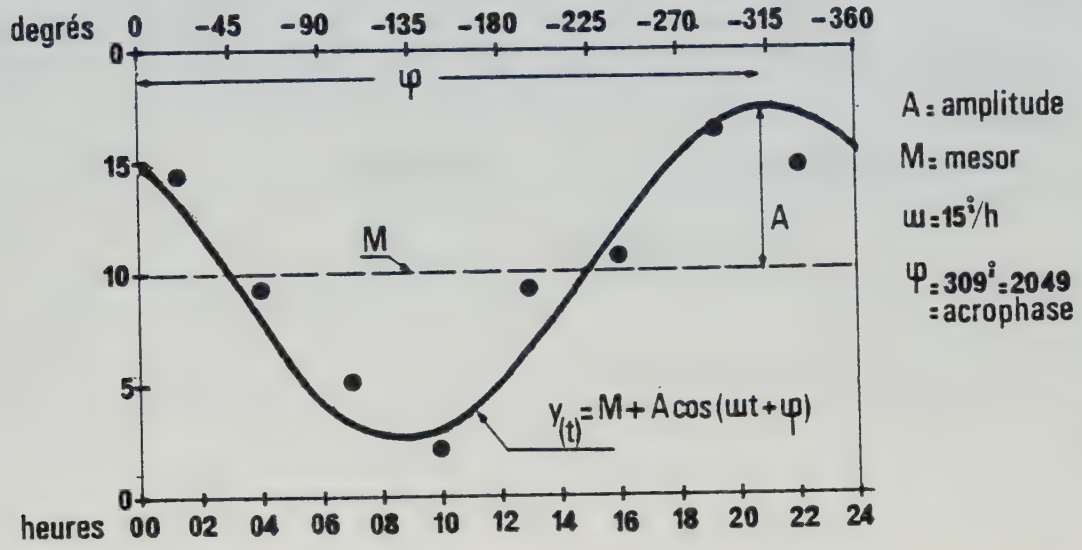
Pour la série temporelle présentée dans (c), le cosinor aligne les points expérimentaux sur une sinusoïde avec un degré de confiance de 80 % (ligne pointillée) ce qui, statistiquement, est refusé en tant que rythme sinusoïdale. Ceci ne prouve pas que l'on a pas de rythme mais simplement que celui-ci étant dissymétrique (ligne continue) la méthode du cosinor est inadéquate pour traiter ce type de rythme. Dans la série temporelle figurée dans (d) le cosinor peut indiquer un rythme avec un degré de confiance supérieur à 95 % (ligne pointillée), en fait en multipliant les données expérimentales on montre que l'on a un phénomène pulsé (ligne continue). Enfin, et nous tirons cet exemple de nos propres résultats, dans la série figurée en (e) le cosinor aligne les points sur une sinusoïde avec un degré de confiance de 98 % en annulant le premier pic.

Ces raisons nous ont amené à utiliser pour mettre en évidence les rythmes circadiens de capacité enzymatique et déterminer leurs paramètres, la méthode du cosinor et la méthode du lissage de courbe en utilisant la "moyenne flottante" sur trois points qui a l'avantage, dans la plupart des cas, de conserver les phénomènes annexes au rythme principal, quand ils sont suffisamment importants.

c) Représentation graphique

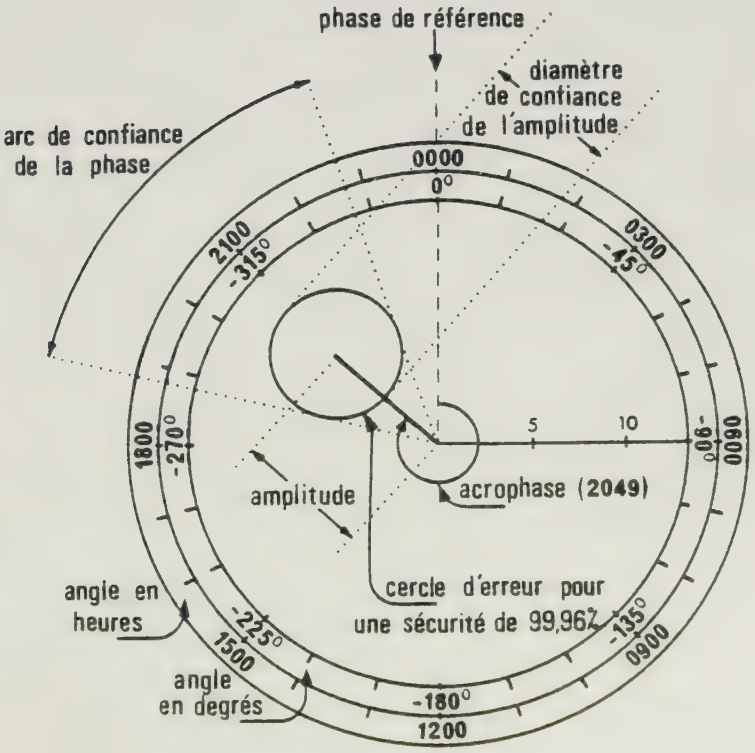
Représentation en coordonnées planes .

La fonction mathématique obtenue après le calcul est du type $Y_{(t)} = M + A \cos(\omega t + \varphi)$, sa représentation en coordonnée plane est figurée ci-dessous :



Représentation en coordonnée polaire .

Elle a l'avantage de présenter la fonction mathématique avec tous ses paramètres et les indices de dispersion de l'amplitude et de la phase.



PREMIERE PARTIE

LE CONTROLE DE LA GLYCOLYSE PAR LA PHOTOPERIODE

I

COORDINATION DU FONCTIONNEMENT DU RESEAU METABOLIQUE APRES UN CHANGEMENT DE PHOTOPERIODE

A. COORDINATION AU NIVEAU DES CAPACITES ENZYMATIQUES

1. Description des évènements

a) Variation de capacité des enzymes de la voie CAM

α. *Variation de la rythmicité circadienne*

C'est en 1968 que QUEIROZ met en évidence le développement d'un rythme circadien de capacité de la PEPC (fig.1) et de l'EM sous l'action des JC chez *Kalanchoe blossfeldiana*. La phase des oscillations journalières de capacité enzymatique de la PEPC reste relativement fixe durant les 45 premiers JC (QUEIROZ et MOREL, 1974 a). Dans le même matériel il a été montré une rythmicité des échanges de CO_2 (QUEIROZ, 1970 confirmant les résultats de GREGORY et coll., 1954) et des teneurs en malate (QUEIROZ, 1975).

β. *Variation des niveaux de capacité enzymatique*

Après le changement de photopériode (passage de JL à JC), le niveau de fonctionnement de la voie CAM augmente. Durant les 50 premiers JC il y a une augmentation exponentielle du contenu en malate des feuilles (fig.2 a, QUEIROZ et MOREL, 1974 a), une augmentation de capacité de fonctionnement des enzymes de la voie CAM (fig. 2 b, MOREL et coll., 1972), une corrélation pratiquement linéaire entre l'augmentation de capacité enzymatique de la PEPC et la production de malate (fig. 2 c, QUEIROZ et MOREL, 1974 a) et entre l'amplitude et le mesor des oscillations de capacité enzymatique de la PEPC et de l'EM (fig. 2 d, QUEIROZ et MOREL, 1974 a).

La rythmicité circadienne de fonctionnement métabolique in vivo, montrée par la rythmicité des échanges de CO_2 et des teneurs en malate, correspond, en termes de phase et d'augmentation de niveau de fonctionnement, aux variations de la rythmicité circadienne de la capacité des enzymes de la voie CAM.

b. Variations de capacité des enzymes de la glycolyse

α. *Variation de la rythmicité circadienne*

Sous les quatre stades du traitement photopériodique choisis (JL, 12 JC, 26 JC, 40 JC) les oscillations circadiennes de capacité des enzymes de la glycolyse (fig.3) sont bimodales en JL et au 12ème JC et pratiquement unimodales aux 26ème et 40ème JC (ce résultat sera plus particulièrement discuté dans le paragraphe I-A-4-b). La phase des oscillations de chaque enzyme en JL et au 12ème JC, et au 26ème et 40ème JC reste relativement fixe, un déphasage se produisant entre le 12ème et 26ème JC pour la PFK, la PGM, l'énolase, la PEPC (tableau II).

β. *Variation des niveaux de capacité enzymatique*

Après le changement de photopériode et durant les 40 premiers JC (fig.4) les modifications de la capacité des enzymes étudiées se font selon deux processus:

- Pendant les 12 premiers JC, la PGM et l'énolase ont un niveau de capacité qui diminue. Ce même phénomène a été observé pour la G-3-PDH (PIERRE et QUEIROZ, 1972) dont la capacité diminue jusqu'au 7ème JC et pour la PEPC dont l'augmentation ne débute qu'après 7 JC (BRULFERT et coll. 1975). Durant cette période, définie comme une période de latence par ces auteurs, la quantité de malate présente dans les feuilles diminue (QUEIROZ, 1966) et sa composition isotopique n'est pratiquement pas modifiée par rapport aux JL (DELEENS et coll., 1979).

- Après 12 JC, les augmentations de capacité enzymatique sont d'ordre exponentiel (fig.4, encart).

Il existe une relation plus ou moins forte entre les variations des amplitudes et les niveaux moyens des oscillations de chaque enzyme de la glycolyse avec le nombre de JC (fig.5). Pour la G-6-PDH, première enzyme de la voie des Pentoses Phosphates, la capacité enzymatique maximale journalière diminue avec le nombre de JC.

L'augmentation du niveau de fonctionnement et les oscillations circadiennes de capacité de certaines enzymes de la glycolyse sont concomittantes à l'augmentation et l'oscillation circadienne de capacité de la PEPC après une période de latence d'au moins 12 JC.

2. Coordination du fonctionnement suivant une loi d'allométrie

Une loi d'allométrie simple (HUXLEY et TESSIER, 1936) s'exprime par une relation de la forme $y = bx^{\alpha}$ soit $\log y = \alpha \log x + \log b$ où y est la dimension d'un organe en croissance (taille, poids, etc..) , x la dimension de l'organisme ou d'un organe de référence également en croissance , α la constante d'équilibre ou pente de la droite, b une constante. Dans le cas présent,x = capacité maximale de la PEPC, représentative du niveau maximal de fonctionnement de la voie CAM, y = capacités maximales des enzymes de la glycolyse, représentatives du niveau maximal de fonctionnement de la voie glycolytique. La relation d'allométrie permet de décrire exactement et de traduire avec fidélité les modalités de la croissance. TESSIER (1948) explique qu'il y a allométrie de croissance dès que les grandeurs comparées sont inégalement variables et isométrie si les coefficients de variabilité sont les mêmes. Il précise que "l'allométrie sera d'autant plus exactement suivie qu'il y aura moins de causes modifiant une des variables indépendamment de l'autre". Donc la loi d'allométrie témoigne d'une sensibilité de deux variables à l'ensemble des facteurs perturbateurs, cette sensibilité pouvant être inégale. Le coefficient α donne le degré de sensibilité relatif à ces facteurs par rapport à celui de la variable de référence.

a. Allométrie entre les enzymes de la voie CAM

Une cohérence de fonctionnement sous forme d'allométrie a été mise en évidence entre la PEPC et l'aspartate aminotransférase, qui utilise comme substrat l'acide oxaloacétique produit par la β carboxylation (QUEIROZ et MOREL, 1974a) ; l'EM et l'alanine aminotransférase, qui utilisent le pyruvate comme substrat, ne sont pas liées à la PEPC par une loi du même type (QUEIROZ et MOREL, 1974 a).

b. Allométrie entre les enzymes de la glycolyse et la PEPC

Les enzymes de la glycolyse et la PEPC sont liées par une loi d'allométrie simple (fig.6 a et 6 b). Jusqu'au 40ème JC (fig. 6 a), les constantes d'équilibre α sont inférieures à 1 ce qui signifie que la capacité enzymatique de la PEPC est moins sensible au contrôle par la photopériode que la capacité des enzymes de la glycolyse. Plus précisément, il convient de noter :

- jusqu'au 40ème JC (fig. 6 a), le fort degré de corrélation entre PFK, G-3-PDH, PGM, énolase et PEPC, le faible degré entre aldolase et PEPC ; une possibilité d'isométrie entre certaines enzymes de la glycolyse (celles dont les α sont sensiblement identiques).

- après le 40ème JC (fig. 6 b), le stade critique sous forme d'un point anguleux où le coefficient α devient supérieur à 1 pour la PFK et l'énolase et ne semble pas modifié par l'aldolase. Donc le degré de sensibilité à la photopériode de la PEPC diminue après le 40ème JC, ceci confirme l'inversion du sens de variation de la PEPC et de la teneur en malate des feuilles vers le 60ème JC (QUEIROZ et MOREL, 1974).

Le contrôle exercé par la photopériode maintient une forte coordination de fonctionnement entre certaines enzymes de la glycolyse et de la voie CAM.

3. Notion de groupes d'enzymes. Blocs fonctionnels

Une importante modification de la rythmicité journalière de la capacité enzymatique a lieu avec le changement de photopériode (fig.3 et tableau II). En JL et au 12ème JC, pour toutes les enzymes de la glycolyse et pour la PEPC, les rythmes apparents ont une période de 12 heures. Aux 26ème et 40ème JC, les rythmes apparents ont une période de 24 heures. Ceci a été confirmé par Monsieur A. REINBERG, Directeur de Recherches au C.N.R.S., E.R. de Chronobiologie Humaine, en appliquant à nos résultats la méthode du Cosinor (tableau III et fig.7) . Du fait de l'unicité des relations de phase entre oscillations (fig.8) nous considérerons qu'en JL et au 12ème JC toutes les enzymes de la glycolyse forment un seul groupe d'oscillateurs. Au 26ème et 40ème JC, en considérant les relations de phase avec la PEPC, il apparaît que la PFK, la PGM et l'énolase forment un premier groupe, tandis que l'aldolase et la G-3-PDH forment un second groupe sensiblement en opposition de phase avec la PEPC. Considérant que le rythme de capacité est un facteur déterminant

du rythme d'activité, en respectant l'ordonnance des enzymes et en ignorant à ce stade de la discussion, les possibilités de régulation, on peut déterminer le long de la voie de la glycolyse, trois blocs fonctionnels : la PFK, avec un maximum d'activité vers 2300, l'aldolase et la G-3-PDH, avec un maximum vers 0800, la PGM, l'énolase et la PEPC, avec le maximum vers 2300 (fig.8).

Le contrôle exercé par la photopériode sur les oscillations de capacité enzymatique maintient, en JL, toutes les enzymes en phase. Au 40ème JC le contrôle modifie la phase des rythmes des enzymes de la glycolyse et détermine trois blocs fonctionnels.

4. Coordination dans la composition isozymique de la glycolyse et de la voie CAM

a. Les isozymes de la voie CAM

BRULFERT et collaborateurs (1979) ont mis en évidence deux formes, au moins, de la PEPC. Une des formes (P.M. = 175 x 10^3) prévaut sous le régime photopériodique de JL, l'autre (P.M. = 186 x 10^3) sous le régime de JC. Ce sont les premiers résultats reliant directement des formes isozymiques à la réponse au changement des conditions photopériodiques.

Pour les autres enzymes de la voie CAM, différentes protéines localisées dans différents compartiments ont été mises en évidence : MUKERJI et TING ont montré la présence de trois MDH (NAD) localisées dans les mitochondries, les microorganites et la fraction soluble du cytoplasme chez *Opuntia* (1969) et de trois isozymes de l'EM localisées dans les chloroplastes, mitochondries et cytoplasme (1968) également chez *Opuntia*.

b. Les isozymes de la glycolyse

Notre étude s'est limitée à la mise en évidence de deux formes isozymiques de la PFK présentant dans leurs rapports quantitatifs des différences entre le régime de JL et le régime de JC (fig.9).

En JL, la forme qui prédomine (pic 2) est éluée à 0,34 molaire de tris-HCl (moyenne de trois expériences) , elle correspond à la forme mineure en JC ; la forme qui prédomine en JC (pic 1) est éluée à 0,27 molaire de tris-HCl (moyenne de quatre expériences). Nous avons également déterminé le profil de la MDH (NAD) qui, avec deux pics, est éluée avant la PFK.

Une interprétation des résultats concernant les deux isozymes de la PEPC a été proposée par BRULFERT et coll. (1979) en relation avec notre hypothèse (PIERRE et QUEIROZ, 1979) concernant la transformation d'un rythme apparent de 12 heures de période en JL et au 12ème JC en un rythme de 24 heures de période aux 26ème et 40ème JC (fig.10).

Nous considérons qu'en JL les rythmes de 12 heures de période observés seraient la résultante de deux rythmes de 24 heures correspondant à deux populations de chaque enzyme, oscillant en opposition de phase. Seule la population "active surtout durant la période nocturne serait sensible au changement de photopériode et augmenterait de façon exponentielle. Cette hypothèse pourrait impliquer que les deux populations appartiennent à des compartiments différents et participent à un type de métabolisme différent. En faveur de la compartimentation il a été montré la présence d'enzymes de la glycolyse dans les chloroplastes : la glucose phosphate isomérase et la phosphoglucomutase chez les plantes CAM (HERBERT et coll., 1979), la PFK chez les plantes en C_3 et C_4 (KELLY et LATZKO, 1975, 1977), l'aldolase et la triose phosphate isomérase chez les plantes en C_3 (LATZKO et GIBBS, 1968 ; BUKOWIECKI et ANDERSON, 1974) et chez les plantes en C_4 (SLACK et coll., 1969) ; la phosphoglycérate mutase et l'énolase chez les plantes en C_3 (MURPHY et LEECH, 1978).

Nous supposons donc que les populations "actives surtout durant la période nocturne" du cycle appartiennent au compartiment cytoplasmique et sont sensibles au contrôle photopériodique, tandis que les populations "actives surtout durant la période diurne" du cycle appartiennent à un autre compartiment, éventuellement chloroplastique, et sont peu ou pas sensibles au changement de photopériode . En ce qui concerne les isozymes (fig.9) le pic 2 , représenterait la population "active surtout pendant la période diurne" et le pic 1 la population "active surtout durant la période nocturne" du cycle de 24 heures.

La possibilité de deux formes d'une même population dans un seul compartiment avec la transformation progressive d'une forme isozymique dans l'autre doit être également envisagée. Chez la Canne à sucre (GOATLY et coll., 1975), une modification des propriétés de la PEPC a été observée lors du verdissement du matériel sous la forme d'une augmentation d'activité de l'enzyme sans qu'il y ait synthèse de nouvelles molécules. Chez le Sorgho, VIDAL et coll. (1976) ont montré le même phénomène et leurs résultats sont interprétés comme signifiant la transformation progressive d'une isozyme peu active dans le matériel étiolé en une isozyme active dans le matériel soumis à la lumière. Appliquée à nos résultats, cette interprétation signifierait qu'en JL

les deux formes de la même enzyme coexistent dans le même compartiment et qu'après le changement de photopériode la forme "active surtout durant la période diurne" du cycle se transformerait progressivement dans la forme active surtout durant la nuit ; ceci impliquerait donc la disparition progressive de la "forme de jour", ce qui n'est pas le cas puisqu'elle est dosable, au moins jusqu'au 40ème JC sur DEAE cellulose (BRULFERT et coll., 1979 ; et fig.9) qu'au niveau des rythmes de capacité enzymatique (fig.3, PFK, énolase, PEPC). D'autre part, dans les jeunes feuilles de *Kalanchoe blossfeldiana* il y a une fixation de type C_4 en JL avec une réutilisation efficace du CO_2 fixé (DELEENS et coll., 1979) ; ce métabolisme CAM reste à un faible niveau comparé au métabolisme de type C_3 et il devient de plus en plus efficace avec le nombre de JC. Reprenant les résultats de GOATLY et de VIDAL on ne peut les appliquer qu'aux seules populations "actives surtout pendant la période nocturne". Mais gardant en mémoire la notion de capacité enzymatique, l'augmentation du niveau de fonctionnement des populations "actives durant la période nocturne" avec le changement de photopériode peut être également le résultat, soit d'une synthèse *de novo* de nouvelles molécules d'enzymes, soit du démasquage progressif d'une population existant, pour la majorité des molécules, à l'état inactif. Aucun résultat, à notre connaissance, ne permet actuellement de trancher entre ces trois hypothèses.

Donc, en conclusion, sous les deux régimes photopériodiques de JL et de JC il y a, pour chaque enzyme étudiée, deux populations oscillant en opposition de phase. Ces deux populations sont supposées appartenir à deux compartiments différents. Les populations "actives surtout durant la période diurne" du cycle, éventuellement non cytoplasmiques, sont insensibles au changement de photopériode. En ce qui concerne les populations enzymatiques "actives surtout durant la période nocturne", localisées dans le cytoplasme, l'augmentation de capacité observée après le changement de photopériode, déterminante pour le niveau de fonctionnement du système CAM, peut être le résultat soit de la transformation d'une isozyme peu active en une isozyme active, soit de la synthèse *de novo* de nouvelles molécules, soit du démasquage progressif de molécules existant à l'état inactif.

Sous le contrôle de la photopériode, des modifications observées dans la composition (qualitative ou quantitative) des populations des enzymes de la glycolyse actives surtout durant la période nocturne du cycle de 24 heures, contribuent à l'établissement du système CAM.

B. COORDINATION AU NIVEAU DES POOLS D'INTERMEDIAIRES

1. Variation de la rythmicité circadienne

La fig. 11 montre les oscillations circadiennes de la concentration des intermédiaires de la glycolyse sous les différents régimes photopériodiques. Comme pour les capacités enzymatiques, la phase des rythmes est également modifiée entre le JL et le 40ème JC (tableau IV). Il est à noter que cette modification n'est établie qu'après le 12ème JC (période de latence), et que sur le critère de la phase des rythmes on peut déterminer l'existence de deux groupes de pool (G-6-P et F-6-P: maximum nocturne ; F-1,6-biP, T.P., 3-PGA, 2-PGA, PEP: maximum diurne) en JL, et trois groupes de pools (G-6-P et F-6-P: maximum en début de période nocturne, F-1,6-biP et T.P. en fin de période nocturne ; 3-PGA, 2-PGA et PEP: maximum diurne) en JC (tableau V et fig.12).

2. Variation de la taille des pools avec la photopériode

Comme pour les capacités enzymatiques, il y a modification de la valeur moyenne comme du maximum journalier de la concentration en intermédiaires de la glycolyse après le changement de photopériode (fig.13). Avec le nombre de JC, la concentration en G-6-P et F-6-P tend à diminuer et les intermédiaires qui suivent l'étape PFK tendent à s'accumuler.

Chercher une coordination de fonctionnement entre la voie de la glycolyse et la voie CAM à travers les variations de la taille des pools des différents intermédiaires est plus délicate que pour les capacités enzymatiques du fait que la glycolyse peut être considérée comme un système ouvert (aucun substrat ne s'accumule) et la voie CAM comme un système fermé pendant la période nocturne (l'accumulation du malate dans la vacuole donnant alors une image du niveau de fonctionnement de la voie). Néanmoins, la modification des phases des oscillations circadiennes des pools de la glycolyse pourra être interprétée, ainsi qu'on le verra ultérieurement, comme un signe de l'existence de mécanismes de coordination assurant une fourniture de substrat pour la PEPC.

C. DISCUSSION

Le changement de photopériode utilisé dans cette étude agit comme une modification prolongée d'un facteur de l'environnement. Dans les jeunes feuilles la modification du type de fixation de CO_2 implique la modification du programme métabolique établi en jours longs pour assurer, en jours courts, un approvisionnement en chaînes carbonées nécessaire au métabolisme diurne. Cet approvisionnement est obtenu par l'augmentation du niveau de fonctionnement de la voie CAM permettant, pendant la période nocturne de chaque photocycle, la mise en réserve dans la vacuole du malate. Le malate peut être considéré par sa décarboxylation comme une réserve,de CO_2 pour la photosynthèse, de pyruvate pour alimenter le cycle de KREBS ou la gluconéogenèse, de pouvoir réducteur par la production de NADPH.

1°) Modalités métaboliques

En étendant à d'autres voies métaboliques l'étude de l'effet d'un changement brusque de photopériode, tel que nous le pratiquons au laboratoire, il a été montré que le réajustement concernait le cycle de KREBS (MOREL, 1979 a), les acides aminés (MOREL, 1979 b), la voie des polyphénols (BALSA et coll., 1979),les polyamines (MOREL et coll., 1980) (fig.14).

En ce qui concerne la glycolyse nous avons en résumé, la séquence d'évènements suivante :

- en JL : les capacités des enzymes de la glycolyse et de la voie CAM sont faibles, toutes les enzymes sont en phase. La capacité de la G-6-PDH, première enzyme de la voie des Pentoses Phosphates est élevée.

- Entre le JL et le 12ème JC : la phase de latence est caractérisée par une diminution de la capacité de quelques enzymes de la glycolyse, ce qui se traduit par une diminution de l'accumulation de malate, les enzymes restent en phase par rapport à la situation de JL.

- Après le 12ème JC : l'augmentation de la capacité des enzymes de la glycolyse et de la voie CAM ainsi que les modifications dans la composition isozymique se font de manière coordonnée. On observe une modification de la phase des oscillations circadiennes de capacité. La capacité enzymatique de la G-6-PDH diminue.

En ce qui concerne la diminution de la capacité de la G-6-PDH après le changement de photopériode, elle est à rapprocher de la diminution de fonctionnement de la voie des polyphénols. Il a été montré (BRULFERT et coll., 1973)

que des substances du type tannins extraites des feuilles de *Kalanchoe blossfeldiana* placés en JL peuvent inhiber la PEPC, la MDH et l'aspartate aminotransférase, mais n'inhibent pas la G-6-PDH et l'EM. Ces substances inhibitrices ont pour origine la condensation d'une molécule de PEP (produit par la glycolyse) et d'une molécule d'erythrose-4-Phosphate (produit par la voie des Pentoses Phosphates). La diminution de la quantité de tannins avec le nombre de JC (BALSA et coll., 1979) est cohérente avec la diminution de la capacité de la G-6-PDH de la PAL, et de la p.c.: coA ligase (enzymes de la voie de biosynthèse des polyphénols) (ALIBERT , BRULFERT, QUEIROZ, BOUDET, non publié) et l'augmentation de capacité de la PEPC.

En ce qui concerne la fourniture de chaînons carbonés pour alimenter le cycle de KREBS, nos dosages du pool de pyruvate (fig.15) aux 26ème, 40ème, 55ème et 68ème JC montrent un premier maximum en début de période nocturne et un second en fin de cette même période, similaire au profil de variation obtenu au niveau du cycle de KREBS pour la taille des pools d'intermédiaires (MOREL, communication personnelle). L'origine des sucres alimentant le cycle de KREBS a fait l'objet d'un certain nombre d'études. En 1969, KLUGE montre les relations entre température nocturne, consommation d'amidon, fixation de CO_2, synthèse de malate, (à 10°C, la fixation de CO_2, la synthèse de malate, la consommation d'amidon sont maximum; à 35°C, la fixation de CO_2 est compensée par la production de CO_2, il n'y a pas de consommation d'amidon). Ceci impliquait que les substrats nécessaires à l'alimentation du cycle de KREBS ne provenaient pas de l'amidon. L'effet de la température nocturne sur les échanges de CO_2 a été confirmé par KLUGE et coll., 1974b; SZAREK et TING, 1974 ; NEALES, 1975). SUTTON (1975 a) a montré que les glucanes étaient impliqués dans la fourniture du PEP, substrat de la β carboxylation, tandis que le pool de sucres solubles, d'origine photosynthétique, était plutôt le "réservoir" alimentant le cycle de KREBS. Le pool de saccharose est surtout synthétisé en fin de période diurne (KLUGE, 1969) alors que le pool de glucanes est peu marqué en ^{14}C durant cette même période (SUTTON, 1975 a).

Ces résultats ont été confirmés par DELEENS et GARNIER-DARDART (1977) qui, utilisant la technique de discrimination isotopique, montrent que le pool de sucres solubles est produit le jour, à partir du cycle de CALVIN et sert la nuit à alimenter le cycle de KREBS par une première voie glycolytique; les glucanes et l'amidon ont pour origine, le jour, le pyruvate (Pyruvate-Pi-dikinase et gluconéogenèse, DITTRICH et coll., 1973) et alimentent en PEP par une seconde voie glycolytique, la nuit, la PEPC qui utiliserait à la fois le CO_2 externe et le CO_2 respiratoire.

D'après KAPLAN et coll. (1976), la vitesse de la respiration n'est pas constante au cours de la période nocturne, une tendance à la diminution apparaissant au milieu de la période nocturne. Ces résultats sont à relier avec ceux de MOREL (1979) qui à partir de ^{14}C-2-pyruvate ou de ^{14}C-(U)-acétate trouve aux 28ème et 56ème JC, un marquage plus important dans les acides du cycle tricarboxylique en début et en fin de période nocturne. En reprenant l'hypothèse de DELEENS de deux voies glycolytiques, il faut considérer que dans la mesure des pools de la glycolyse on a, à tout moment, la somme des pools de la voie glycolytique qui alimente la β carboxylation et de la voie glycolytique qui alimente le cycle de KREBS. La cinétique de fonctionnement de la voie glycolytique alimentant le cycle de KREBS n'est pas connue, cependant on sait que la cinétique de fonctionnement de la voie glycolytique permettant la fabrication du malate est maximum durant la première moitié de la période nocturne ; ceci correspondrait au premier pic de pyruvate montré dans la fig.15, l'augmentation de ce pool pouvant être expliquée par le fait que dans le cas où la capacité de l'enzyme malique est en phase avec celle de la PEPC, une partie du malate, au lieu d'être stocké dans la vacuole est décarboxylé en pyruvate ; ceci a été confirmé par un marquage plus important dans le pyruvate et les acides du cycle de KREBS à partir de ^{14}C-(U)-malate (MOREL, 1979a). Le deuxième pic de pyruvate serait alors le reflet du fonctionnement de la voie glycolytique qui alimente le cycle de KREBS à partir des sucres solubles, ce qui serait en accord avec le marquage des acides du cycle obtenu à partir du ^{14}C pyruvate ou du ^{14}C acétate (MOREL, 1979a).

2°) Les constantes de temps

Le changement de photopériode produit un réajustement du métabolisme intermédiaire, avec la mise en place d'un nouveau programme physiologique par rapport à la situation en Jours Longs. Ce réajustement touche un réseau de voies biochimiques fortement interconnectées et il se traduit par une modification des balances de fonctionnement de ces voies les unes par rapport aux autres.

De manière générale, le niveau de fonctionnement de chaque voie métabolique dépend, à l'instant t, de l'environnement climatique qui contrôle la concentration en enzyme et de l'environnement biochimique qui régule l'activité des enzymes de la voie. A l'instant t + m (m de l'ordre de quelques minutes) le niveau de fonctionnement de la voie dépendra des modifications de l'environnement biochimique (régulation par le pH local, par des effecteurs positifs ou négatifs ou par des changements dans la compartimentation), dans des limites imposées pour le programme physiologique compatible avec l'envi-

ronnement climatique, considéré comme inchangé à t + m par rapport à t. A l'instant t + j (j de l'ordre de la journée ou de plusieurs jours), le niveau de fonctionnement dépendra surtout des modifications de l'environnement climatique qui, par exemple, contrôle de façon coordonnée la modification de la concentration de certaines enzymes de la voie ou la phase des oscillations circadiennes ; l'environnement biochimique jouant également son rôle régulateur mais toujours dans les limites imposées par le programme en cours.

Il apparaît alors que l'adaptation saisonnière, qui implique un réajustement du réseau métabolique pour l'établissement d'un nouveau programme physiologique, sera la résultante des mécanismes de contrôle, dont les cibles privilégiées sont les capacités enzymatiques, et des mécanismes de régulation, dont les cibles sont les activités enzymatiques. Les processus de contrôle impliquent des modifications des relations gène - enzyme au sens large, ainsi, l'augmentation du niveau de capacité enzymatique peut être le résultat de la modification du taux de synthèse d'une population d'isozyme par dérépression d'un gène. La rythmicité circadienne de capacité peut être le résultat de la rythmicité soit de la conformation de la protéine, soit d'un effecteur, soit de l'association des sous unités ribosomales, soit de la structure sur laquelle est fixée la protéine. Ces processus de contrôle ont des constantes de temps (souvent plusieurs heures) nettement supérieures aux processus de régulation (quelques minutes ou moins) (GOODWIN, 1963). La régulation peut, dans certains cas, être modulatrice du contrôle exercé par les rythmes de capacité sur les rythmes d'activité, ce qui se traduit par la modification de l'angle phase entre les deux rythmes (fig.16).

Cette notion de constantes de temps que nous venons d'évoquer pour différencier les processus de contrôle et les processus de régulation qui correspondent à deux niveaux hiérarchiques de l'organisation du métabolisme, nous amène à considérer la notion de temps local qui dans la modification du rapport longueur du jour/longueur de la nuit induit l'établissement du nouveau programme physiologique. Ceci implique que l'organisme soit capable de mesurer le temps ou plus exactement, les intervalles de temps qui séparent les signaux début de jour, début de nuit ; ces signaux déterminent les rapports longueur du jour/longueur de la nuit.

Dans nos expériences au Phytotron, le passage du régime photopériodique de Jour Long au régime de Jour Court est réalisé en modifiant la position du signal début de nuit, la position du signal début de jour restant inchangée. La suite de notre étude a porté sur l'effet du signal début de nuit et de l'heure où il intervient dans le cycle journalier sur la capacité enzymatique, et son rôle dans le processus de réajustement saisonnier du fonctionnement de la glycolyse et de la voie CAM.

II

LA MESURE DU TEMPS ASSURE LA COORDINATION DU RESEAU METABOLIQUE

La possibilité, pour un organisme, d'être capable de mesurer le temps implique qu'un certain nombre d'étapes soient réalisées (QUEIROZ, 1979a):

- détection du périodisme externe et transduction de l'information relative aux signaux reçus

- évaluation temporelle de cette information la situant par rapport à celles précédemment reçues

- transfert de l'information vers les mécanismes aptes à conserver ou à modifier le programme en cours.

Chez le *Kalanchoe blossfeldiana*, la détection des changements photopériodiques par le phytochrome (BRULFERT et coll., 1976) et la transduction de cette information au niveau biochimique, conduisent à des réajustements des programmes métaboliques selon la photopériode, en particulier en ce qui concerne le niveau de fonctionnement de la glycolyse (Chapitre I). Dans ce contexte, l'étude de l'effet du signal jour/nuit (qui détermine la photopériode d'après sa position dans le cycle de 24 heures) sur les capacités enzymatiques (cibles privilégiées du contrôle assurant le programme) devrait constituer une approche des processus qui permettent à l'organisme de mesurer et de situer la nouvelle information (JC) par rapport à celle précédemment reçue (JL).

A. ROLE DU SIGNAL JOUR/NUIT

1. Heure du pic de capacité relativement au signal jour/nuit selon le régime photopériodique

D'après ce qui a été dit dans le chapitre précédent, nous considérerons que seule participe à l'élaboration du système CAM la population d'enzymes dont la capacité est maximale durant la période nocturne, quel que soit le régime photopériodique.

La fig.8 résume les résultats obtenus en ce qui concerne le rythme de capacité des enzymes glycolytiques en phase avec la PEPC. En JL (niveau de CAM faible), les pics de capacité se situent vers la fin de la nuit (0700) soit environ 6 heures après le signal "début de nuit". Au 40ème JC (niveau de CAM élevé), les pics se situent dans la première partie de la période nocturne (2300) mais toujours, environ 6 heures après le signal. Au 12ème JC, qui correspond au temps de latence de la réponse aux Jours Courts, le pic nocturne a gardé sa position (0700) sur le cycle de 24 heures malgré le déplacement du signal jour/nuit dû au changement de photopériode.

Ceci suggère donc l'existence d'une relation fixe entre la position du signal "début de nuit" sur la grille de 24 heures et la position des pics de capacité, cette relation se rétablissant après un temps de latence lorsque la photopériode est modifiée. Un tel phénomène est évidemment symptomatique d'un entraînement du rythme enzymatique par le signal "début de nuit". Par contre dans le cas de l'aldolase et de la G-3-PDH, les pics restent fixés à 0700 (fig.8 et tableau 2) quel que soit le régime photopériodique, ce qui suggère que l'entraînement par la photopériode ne s'exercerait pas sur ces enzymes ou bien que la phase est définie par le signal "début de jour". La rythmicité d'émission de CO_2 chez *Bryophyllum fedstchenkoï* et de fixation de CO_2 chez *Kalanchoe blossfeldiana* a été respectivement mise en évidence par WILKINS (1959) et par GREGORY et coll. (1954) et QUEIROZ (1965). L'origine endogène de cette rythmicité a été montrée par WILKINS (1965). Selon QUEIROZ (1974) le rythme de fixation de CO_2 est un indicateur de l'activité *in vivo* de la PEPC, et il est synchrone avec le rythme de capacité de cette même enzyme.

Les oscillations de capacité enzymatique de la PEPC répondent aux critères de la rythmicité endogène (cf. définitions) : en condition continue de lumière, la rythmicité persiste et l'on retrouve, comme pour la condition photopériodique de JL, une période de l'ordre de 12 heures ; le rythme peut être déphasé par un signal externe (rouge sombre) et persiste en libre cours (QUEIROZ et BRULFERT, 1975). Un rythme endogène de sensibilité à la lumière a été mis en évidence par de brefs éclairements (30 min. de rouge clair + 15 min. de rouge sombre) espacés de 10 heures, donnés à divers moments de la période d'obscurité de 15 heures : l'augmentation de capacité enzymatique n'a lieu que pour une position bien définie de cet intervalle de 10 heures (QUEIROZ et BRULFERT, 1975; QUEIROZ, 1979b). BRULFERT et coll. (1975) ont montré que le couplage entre le rythme de capacité enzymatique de la PEPC et le rythme photopériodique était strict en JL et que l'entraînement est plus lâche en JC, l'acrophase du rythme ne devenant relativement fixe qu'après un délai de transition de l'ordre de 15 JC.

C'est à partir des travaux fondamentaux de nombreux auteurs (voir ASCHOFF, 1965) que nous avons été amenés à considérer la relation entre le signal jour/nuit et la phase des rythmes de capacité enzymatique. DAAN et PITTENDRIGH (1976) ont montré, étudiant des populations de rongeurs placés en condition continue d'obscurité, qu'un bref éclairement (15 min.) produisait un déphasage du rythme d'activité nocturne. Suivant le moment où est donné cet éclairement on observe soit une avance, soit un retard, soit aucune modification de la phase du rythme. Ces résultats sont à rapprocher de ceux de WILKINS (1969) et QUEIROZ et BRULFERT (1975) qui obtiennent des effets similaires respectivement avec le rythme d'émission de CO_2 chez *Bryophyllum fedstchenkoï* et le rythme de capacité de la PEPC chez le *Kalanchoe blossfeldiana*. Il est à remarquer (fig.17) que le déphasage du rythme d'activité est atteint dès le 1er cycle suivant le signal dans le cas d'un retard de phase mais que dans le cas d'une avance de phase il y a une période de transition d'au moins 4 cycles de 24 heures avant que le rythme ne se stabilise, retrouvant la période τ du libre cours. Pour mieux définir ces phénomènes d'entraînement, PITTENDRIGH et DAAN (1976) ont employé la méthode dite des "photopériodes squelettiques" : dans des conditions d'obscurité continue, la photopériode est simulée par 2 brefs éclairs lumineux donnés aux moments correspondant à ce qui aurait été le début et la fin du jour dans les conditions photopériodiques réelles ; il a été montré dans de nombreux cas, par divers auteurs, que les organismes répondent à ce "squelette" de photopériode comme ils auraient répondu à la photopériode correspondante. Dans le cas discuté ici, les auteurs ont montré que l'avance de phase du rythme provoquée par le premier signal sera compensée par un retard de phase provoqué par le deuxième signal ce qui aura pour effet de maintenir la période du rythme d'activité nocturne de ces rongeurs à une heure fixe du temps circadien (fig.18); ils ont de plus montré que l'entraînement ainsi obtenu par l'effet conjugué des 2 signaux est particulièrement stable.

Dans une autre étude PITTENDRIGH (1965) montre que selon l'intervalle compris entre les deux signaux, avec l'un d'eux fixe sur l'échelle de temps circadien, on modifie la relation entre le signal "mobile" et la phase d'activité (fig.19).

2. Modification de la capacité enzymatique avant et après le signal jour/nuit

L'étude détaillée des variations de capacité enzymatique précédant et suivant le passage jour/nuit a apporté des résultats sensiblement similaires pour chaque régime photopériodique choisi (fig.20). Dans les deux heures qui précèdent le signal, les capacités enzymatiques augmentent pour atteindre un maximum (pic 1) qui se situe, en règle général *avant* le signal ; ce comportement, symptomatique de l'existence d'un mécanisme d'entraînement, sera discuté plus loin. La diminution rapide qui précède le signal se poursuit au-delà de celui-ci, le minimum se situant environ 15 minutes après. La capacité enzymatique atteint un nouveau pic (pic 2) dans la demi-heure ou l'heure qui suit le minimum, le niveau atteint étant sensiblement celui observé pour le pic 1. Le pic 3 (PEPC et PFK en JL) représente l'acrophase du rythme de capacité (voir fig.3). Le pic 2 est considéré comme un "pic de réajustement" dû à l'effet du signal, celui-ci rephasant le maximum journalier (pic 3) par rapport au début de nuit, en maintenant un intervalle de 6 heures quel que soit le régime photopériodique.

Pour l'aldolase (dont l'acrophase reste fixe quel que soit le régime photopériodique) on constate le même type de réajustement au niveau du signal (fig.21). Une interprétation de l'effet du signal sur le pic de fin de période nocturne est plus délicate pour les mesures faites au 36ème JC : si l'on admet l'hypothèse de deux populations d'oscillateurs avec une première population ayant son acrophase en début de nuit et l'autre en fin de nuit, l'effet du réajustement au niveau du signal peut concerner soit une des populations soit les deux simultanément.

Considérant le cas simplifié du mouvement pendulaire, on peut représenter la relation entre la vitesse et le déplacement par un diagramme de phase (fig.22 a) et les modifications dans la relation qu'entraîne deux impulsions (fig. 22 b) . Dans ce cas la stabilité de l'entraînement est assurée par deux impulsions ayant des caractéristiques (intensité, direction) telles que, lorsqu'elles interviennent à des moments adéquats du cycle, leurs effets sur le mouvement pendulaire se compensent sans modifier les caractéristiques de l'oscillation. Par analogie, c'est ce que l'on observe en JL pour les rythmes de capacité enzymatique où la phase et l'amplitude des rythmes sont maintenues pour chaque photocycle par les signaux placés à 0045 et 0845. Dans le mouvement pendulaire si l'on modifie, par exemple, la seconde impulsion dans ses caractéristiques (intensité, direction ou moment), on modifiera les caractéristiques du mouvement (amplitude, phase); par analogie, c'est ce que l'on observe lors du passage de JL en JC sauf pour l'aldolase et la G-3-PDH mais ensuite l'entraî-

nement va obéir aux mêmes règles, après stabilisation de l'horloge. En termes de chronobiologie, cela pourrait indiquer, pour ces deux enzymes, que, en première approximation les deux signaux jour/nuit placés à 1745 ou à 0045 délimitent, dans le rythme endogène de perception des signaux, un intervalle d'"insensibilité", ou le déplacement du signal ne modifie pas la phase du rythme ; ce phénomène est bien connu dans de nombreux autres cas (voir fig.19 ou QUEIROZ et BRULFERT, 1975 pour la PEPC). Une autre explication possible pour la fixité de phase du rythme de l'aldolase et la G-3-PDH est que l'entraînement de ces rythmes serait exercé par le signal début de jour, qui reste fixe dans notre schéma expérimental lors du changement de photopériode.

Les tracés de la fig.20 montrent donc qu'au niveau du signal "début de nuit" il y a une variation rapide de la capacité enzymatique. L'augmentation rapide, après le signal, ne peut probablement pas être expliquée par la synthèse de nouvelles molécules, étant donné le petit intervalle de temps observé entre le minimum et le maximum (30 min. environ) (GOODWIN, 1963). La possibilité de l'action temporaire d'un effecteur négatif entre le pic 1 et le minimum 15 min. après le signal a été envisagée. D'après les résultats obtenus (tableau VI) cette possibilité est à écarter. La possibilité d'une modification temporaire de la conformation de la protéine doit être également envisagée mais si tel est le cas, cette modification ne change pas le K_m (fig.23).

L'ensemble de ces résultats montre que le mécanisme général d'entraînement d'un rythme endogène circadien par la photopériode, jusqu'ici proposé pour le comportement d'organismes ou de populations d'organismes, pourrait intervenir aussi au niveau des populations de molécules. Le rythme serait rephasé par des variations brusques d'activité précédent et suivant le signal; il faut souligner que le rephasage anticipe le signal, ce qui est caractéristique des rythmes endogènes entraînés.

3. Réponse à une modification de la position du signal"jour/nuit": l'entraînement du rythme enzymatique

L'effet d'anticipation de la réponse au signal "début de nuit", aussi bien en JL qu'en JC, implique une aptitude de l'organisme à mesurer avec exactitude l'intervalle de temps entre un signal reçu et le signal précédent. Pour le vérifier, différents lots de plantes ont été soumis au protocole expérimental décrit dans la fig. 24, qui consiste à entraîner le rythme endogène de capacité de la PEPC et la PFK pendant 34 JC par un signal puis à modifier la

position de ce signal sur le cycle de 24 heures soit en l'avançant soit en le retardant d'une heure.

Lorsque le rythme a été entraîné par un signal donné à 1900 (lot 2) on observe, comme précédemment, les deux pics 1 et 2 au 34ème JC ; après avoir déplacé le signal à 1745 au 45ème JC, on retrouve au 48ème JC, la trace de ces deux pics en plus de deux nouveaux pics 1' et 2' situés avant et après le nouveau signal.

Lorsque le rythme a été entraîné par un signal donné à 1700 (lot B) les pics 1 et 2 correspondants au 34ème JC se retrouvent après changement de l'heure du signal (à 1700) en plus d'un pic 2' qui suit le signal. Dans ce cas nous ferons l'hypothèse que le pic 2 se superpose au pic 1' qui précède le nouveau signal.

Ces résultats que l'on doit considérer comme préliminaires, suggèrent que le délai de réponse à la modification de la position du signal sous la forme de la modification rapide de la capacité enzymatique au niveau du signal "jour/nuit" est au plus inférieur à trois cycles photopériodiques et que l'effet d'anticipation est immédiat.

B. DISCUSSION

Dans le Chapitre I nous avons mis en évidence la coordination du fonctionnement de la glycolyse et de la voie CAM grâce aux variations, selon le régime photopériodique, des capacités enzymatiques ; ces variations sont liées par une loi d'allométrie. L'augmentation du niveau de capacité de la PEPC dépend de la position relative des deux signaux "jour/nuit" et "nuit/jour" perçus par le rythme endogène de sensibilité à ces signaux. La coordination du fonctionnement métabolique se fait également par le maintien de la position de l'acrophase des rythmes de capacité relativement au signal "jour/nuit"; l'entraînement du rythme et son rephasage sont assurés par des variations brusques de capacité intervenant au niveau de ce signal. Ces deux derniers phénomènes nous amènent à considérer l'aptitude de l'organisme à mesurer avec précision l'intervalle de temps séparant deux signaux, donc à situer la nouvelle information (JC) par rapport à celle précédemment reçue (JL). Cette aptitude permet à l'organisme d'enclencher une série de modifications du fonctionnement du réseau métabolique, conduisant à l'établissement d'un nouvel état physiologique, à valeur adaptative, en réponse à la modification d'un paramètre de l'environnement (photopériode).

En conditions phytotroniques on réalise le passage de la saison d'été (JL) à la saison d'hiver (JC) en modifiant la position du signal "jour/nuit" sur le cycle de 24 heures et cela en un seul cycle photopériodique. Le nouvel

état physiologique (niveau CAM élevé) n'est véritablement enclenché, dans ces conditions, qu'après une période de latence d'environ 12 jours courts : ceci indique que, lors de la modification de la position du signal photopériodique, le transfert de cette information vers les mécanismes aptes à modifier le programme physiologique en cours (augmentation des populations d'enzymes actives, rephasage du rythme) n'est pas immédiatement réalisé. Ce délai n'implique pas que cette information, détectée par le phytochrome n'a pas atteint immédiatement l'oscillateur endogène (horloge) ; en effet PITTENDRIGH a montré (1960), utilisant des drosophiles, que l'horloge se rephase immédiatement après le signal, mais que le rythme terminal ("aiguilles de l'horloge", dans son cas le rythme d'éclosion des drosophiles ou dans notre cas les capacités enzymatiques) ne se rephase qu'après plusieurs cycles.

Ainsi, en condition phytotronique nous aurions la séquence chronologique suivante :

- en jours longs, le signal "jour/nuit" (0045) est perçu par le phytochrome, l'information est reçue par l'horloge, qui commande le programme physiologique caractérisé par des capacités enzymatiques peu élevées et l'acrophase des rythmes fixés à 0700 ;

- durant la période de latence (12 jours courts), la modification de la position du signal "jour/nuit" (1745) est perçue par le phytochrome, l'information est reçue par l'horloge, la manifestation de cette réception apparaît sous la forme de modifications brusques de la capacité enzymatique autour du nouveau signal et le programme physiologique de jour court qui se met en place, et qui implique des opérations du type synthèse d'isozymes, ne devient efficace (augmentation des capacités, rephasage des rythmes) qu'après une certaine accumulation des effets ;

- en jours courts, d'après les résultats obtenus, on doit envisager une horloge commandant un programme concernant un groupe d'enzymes formé de la PFK, la PGM, l'énolase et la PEPC, dont les capacités augmentent de façon corrélative et dont les acrophases sont en phase, et une autre horloge incapable d'évaluer et de situer le signal de 1745 par rapport à celui de 0045 et qui commande l'aldolase et la G-3-PDH, dont les capacités augmentent peu et les acrophases restent fixes sur le cycle de 24 heures, le rythme pouvant être commandé par le signal "début de jour".

Dans les conditions naturelles, entre la saison d'été (JL) et la saison d'hiver (JC) il y a un changement progressif de l'intervalle de temps qui sépare les deux signaux "début de jour/début de nuit". Pour une valeur critique de cet intervalle, l'horloge commande les mécanismes enclenchant le nouveau programme "CAM actif". Nos expériences au Phytotron montrent que la réponse à la valeur critique n'est pas immédiate (période de latence). Dans le sud de Madagascar, les deux saisons d'hiver et d'été sont caractérisées par une différence dans la longueur du jour entre les solstices d'été et d'hiver d'environ 3 heures, intervalle de temps minimum pour l'induction du programme CAM en conditions phytotroniques. Chacune des deux saisons est caractérisée de plus par les paramètres température, sécheresse et intensité lumineuse qui peuvent induire ou moduler le fonctionnement de la voie CAM (modulation par la thermopériode chez *Kalanchoe blossfeldiana* : QUEIROZ, 1968 ; induction par la photopériode chez d'autres plantes CAM : RANSON et THOMAS, 1960 ; interaction entre induction photopériodique et sécheresse chez *Kalanchoe blossfeldiana* : CHATURVEDI et ZABKA, 1977a et 1977b ; induction par la sécheresse chez d'autres plantes CAM : TING, 1976 ; modulation du fonctionnement de la voie CAM par modification de l'intensité lumineuse chez *Tillandsia usneoïdes* : KLUGE et coll., 1973 ;chez l'ananas :NOSE et coll., 1977). En réponse aux variations de l'environnement climatique, l'organisme doit réajuster son fonctionnement et seule, parmi les 4 composantes du climat citées précédemment, la modification de la longueur du jour sur un cycle annuel est un phénomène régulier et totalement prévisible. Donc si l'organisme doit développer le système CAM, qui est un mécanisme d'adaptation à la sécheresse, l'induction de ce mécanisme ne peut avoir pour seul signal la variation du paramètre climatique peu fiable qu'est l'humidité. En effet, une modification accidentelle ou passagère de ce paramètre pourrait déclencher le réajustement métabolique à contre saison. Par contre, si l'on combine, comme c'est le cas durant la saison d'hiver, les deux paramètres photopériode de jours courts et diminution des précipitations les résultats obtenus au Phytotron sur la période de latence et la capacité par l'organisme de mesurer l'intervalle de temps qui sépare les deux signaux revêtent toute leur importance. Ils montrent que le *Kalanchoe blossfeldiana* a la capacité de préparer à l'avance la réponse à la modification d'un paramètre de l'environnement : pour une valeur critique, l'horloge enregistre immédiatement la nouvelle information et met en place les composantes du nouveau programme, mais l'expression de la réponse n'aura lieu que si la modification du paramètre est durable, ce qui assure à l'organisme le réajustement adaptatif à la saison.

DEUXIEME PARTIE

LA REGULATION DE LA CLYCOLYSE SELON LE NIVEAU CAM

I

LES MODELES ACTUELS

A. LE MODELE DE REGULATION ALLOSTERIQUE DE COCKBURN ET Mac AULAY

1. Description du modèle

Ce modèle est le seul, actuellement proposé dans la littérature, qui tente d'expliquer, chez le *Kalanchoe daigremontiana*, l'accumulation nocturne de malate (COCKBURN et Mac AULAY, 1977). Les auteurs ont défini trois périodes : une "phase d'induction" qui suit le passage lumière/obscurité, où peu de malate est synthétisé ; une période où l'accumulation du malate est maximum ; une période, en fin de nuit, où l'accumulation de malate se ralentit. Ces trois périodes sont définies à partir d'une courbe d'acidité totale.

Les auteurs préparent leur matériel, en vue de l'obtention d'une forte accumulation nocturne du malate, en le soumettant à une longue période de lumière préalable, ce qui revient à placer le *Kalanchoe daigremontiana* dans une situation de jours longs; dans ces conditions, d'après MARCELLE (1975), une fixation de CO_2 a lieu tout au long de la période nocturne suivante (fig.25).

Dans leur modèle, les auteurs se proposent de tenir compte à la fois de l'effet négatif d'une forte concentration en CO_2 sur l'activité de la PEPC (WALKER et BROWN, 1957 ; MUKERJI et TING, 1971) et des régulations positives du G-6-P sur la PEPC (TING et OSMOND, 1973) ou négatives du PEP sur la phosphorylase (SUTTON, 1975 c) et sur la phosphofructokinase (KELLY et TURNER, 1968, 1969, 1970 ; SUTTON, 1975 c) et du malate sur la PEPC (KLUGE et OSMOND, 1972 ; QUEIROZ, 1968 ; QUEIROZ et MOREL, 1974 b).

Durant la phase d'induction (schéma 3), la respiration accroît la concentration intracellulaire de CO_2, ce qui aurait pour effet d'augmenter la vitesse de dégradation du pool de réserve d'hydrates de carbone,donc la concentration en G-6-P; il s'ensuivrait une activation de la PEPC ayant pour effet de diminuer la concentration intracellulaire de CO_2, ce qui augmenterait encore l'activité PEPC ; la concentration en PEP diminue, son effet inhibiteur sur la PFK est levé, ce qui correspond à la phase d'accumulation rapide du malate. La vitesse d'accumulation diminue lorsque la quantité de malate est telle qu'elle inhibe la PEPC, ce qui diminue le taux de fixation de CO_2 donc en augmente la concentration intracellulaire, renforçant l'effet inhibiteur sur la PEPC ; en conséquence le pool de PEP augmente de nouveau, ce qui a pour effet

d'inhiber la phosphorylase et la phosphofructokinase : on revient à la situation correspondant à la phase d'induction.

2. L'application du modèle à nos résultats, obtenus en régime de CAM élevé chez *Kalanchoe blossfeldiana*

Pour nous placer dans le cadre très limité de l'expérimentation proposée par COCKBURN et Mac AULAY, nous ne considérerons que les résultats obtenus aux 26ème et 40ème JC, durant la période nocturne. Pour ce nombre élevé de JC, les courbes de fixation de CO_2 et d'accumulation de malate, qui représente 80 % de l'acidité totale (MOREL, communication personnelle), sont représentées dans la fig.26. La différence avec le *Kalanchoe daigremontiana* est que la fixation de CO_2 en fin de période nocturne tend à s'arrêter.

L'interprétation de nos résultats suivant le modèle précédemment décrit nous a conduit également à découper la période nocturne en trois parties en tenant compte de la position des maximums et des minimums obtenue dans la variation des intermédiaires de la glycolyse (fig.27). Durant la première partie (1800-0000) on constate une augmentation en G-6-P cohérente avec une inhibition de la PFK par le PEP, dont la concentration est effectivement élevée. Le G-6-P activerait alors la PEPC, avec diminution du pool de PEP. Entre 0000 et 0430 la diminution du pool de PEP lèverait progressivement l'inhibition sur la PFK ; le pool de G-6-P diminue alors. Dans la dernière partie de la nuit, l'inhibition de la PEPC par le malate peut expliquer l'augmentation de la taille du pool de PEP.

Donc, en première approximation, nos résultats peuvent être interprétés selon le modèle de COCKBURN et Mac AULAY.

B. EXTENSION DU MODELE DE REGULATION ALLOSTERIQUE A PARTIR DE NOS RESULTATS

a) Situation aux 26ème et 40ème Jours Courts, période nocturne

Une étude plus détaillée par la méthode du "crossover point" *(CHANCE et coll., 1958 ; GHOSH et CHANCE, 1964) nous a permis de mettre en évidence que l'étape T.P. → 3-PGA pourrait représenter, aux stades de réajustement de la

---

*Commentaires sur l'utilisation de la méthode du "crossover point"

Cette méthode a été utilisée par CHANCE et coll. pour mettre en évidence la localisation des sites d'actions des inhibiteurs de la chaîne respiratoire. Dans ce système linéaire, la concentration des intermédiaires transporteurs d'électrons est fixe et seul varie le rapport substrat initial/produit final. Les principales limitations de cette méthode sont :

- son utilisation dans le cas d'un tissu composé de plusieurs types de cellules, qui peuvent répondre de façon différente au stimulus externe, la valeur mesurée étant alors une moyenne;
- l'existence d'une compartimentation intracellulaire pour un même intermédiaire, ce qui entraîne une surévaluation de la taille du pool présumé appartenir à la voie métabolique étudiée; (T.S.V.P.)

glycolyse correspondant aux 26ème et 40ème JC, une étape de contrôle (fig.28, 40ème JC). Deux enzymes, la G-3-PDH et la PGK sont responsables de la transformation du GAP en 3-PGA. Entre 1800 et 0430, il semble, d'après les résultats, qu'il y ait inhibition d'une des deux (ou des deux) enzymes. Pour l'activité de la G-3-PDH, le NAD n'est pas limitant, puisqu'il est supposé être produit en grande quantité par la MDH, par contre le GAP et, à un degré moindre, les ions Pi, peuvent être inhibiteurs à haute concentration (DUGGLEBY et DENNIS, 1974) ; or durant l'intervalle 1800-0430, l'équilibre entre DHAP et GAP est nettement en faveur de ce dernier (COCKBURN et Mac AULAY, communication personnelle) et la concentration des ions Pi augmente avec la transformation du PEP en AOA. Une régulation de l'activité de la PGK, si elle est envisagée, pourrait être due, entre 1800 et 0000, à une limitation de la fourniture en ADP par la PFK ce qui ne peut être invoqué entre 0000 et 0430 puisque cette enzyme semble activée.

En fin de période nocturne (0430-0900), il semble qu'il puisse y avoir activation des enzymes situées entre les T.P. et le 3-PGA. L'induction de la G-3-PDH par le GAP et les ions Pi pourrait être levée, la concentration de ces substrats diminuant, mais le NAD pourrait alors être limitant (baisse d'activité de la MDH). Pour la PGK, l'ADP ne serait toujours pas limitant.

- l'intervalle de temps minimum entre deux mesures, qui doit être inférieur ou égal au temps mis par la voie métabolique pour passer d'un état d'équilibre à un autre, après une perturbation ; autrement dit, il faut s'assurer, qu'entre les deux mesures, la voie métabolique ne passe pas par d'autres états d'équilibre.

Il est bien évident qu'une feuille présente une hétérogénéité dans sa composition cellulaire et que la mesure de la taille des pools de la glycolyse représente, pour chaque intermédiaire, la résultante de cette hétérogénéité. De même on ne peut écarter la possibilité de pools multiples du même intermédiaire dans un type de cellule, quoique la possibilité de l'interférence de la voie des Pentoses Phosphates semble pouvoir être écartée en régime CAM élevé d'après SUTTON (1975 c) et d'après les résultats que nous avons présentés dans le premier chapitre (fig.14).

L'exigence théorique selon laquelle la méthode n'est applicable qu'à un système en équilibre strict, dans un milieu constant, pendant la durée de l'expérience, la rend inutilisable dans l'étude de réajustements rapides à un changement brusque du milieu. Son emploi reste cependant possible si on considère des réajustements suffisamment progressifs sur des durées assez longues (par ex. trois stades pendant 40 jours) avec un effecteur externe constant (par ex. un régime photopériodique constant), pour que les analyses portent sur des variations assimilables à des variations monotones ; il en est de même à l'intérieur d'un cycle jour/nuit (lumière constante/obscurité), si on évite de pratiquer les dosages au voisinage du passage jour/nuit, dont on a vu qu'ils entraînent des ruptures dans les variations de capacité et d'activité enzymatique. Dans ce dernier cas, l'emploi de la méthode ne reposerait sur aucune base théorique.

En fait la méthode du crossover point a été ici utilisée dans le souci d'une clarification de l'exposé, car elle permet une visualisation très rapide de l'ensemble des évènements auquel est soumise la glycolyse sur un cycle de 24 heures.

b) Situation en jours longs et au 12ème jour court, période nocturne

L'interprétation des résultats que nous avons obtenus en JL et au 12ème JC (fig.28) est plus délicate du fait de la présence des deux rythmes de capacité enzymatique correspondant aux deux populations qui pourraient être responsables de l'oscillation bimodale, très nettement dissymétrique, obtenue dans la variation journalière de la taille des pools. A ces deux stades du traitement par la photopériode, la méthode du "crossover point" doit être utilisée avec beaucoup de précaution et l'interprétation devient difficile. Nous pensons, pour ces deux régimes photopériodiques, qu'une étape de contrôle au niveau de la PFK est indiscutable (accumulation de G-6-P et F-6-P la nuit, accumulation des autres pools le jour) et c'est actuellement la seule étape de régulation que nous envisagerons.

c) Situation pendant le jour, en Jours Longs et Jours Courts

Les cinétiques de variations de la taille des pools de la glycolyse durant la partie diurne du cycle montrent (surtout aux 26ème et 40ème JC),fig.28, que la PEP et ses précurseurs, 2-PGA et 3-PGA, s'accumulent en fin de période diurne et ne sont pas limitants pour l'activité de la PEPC en fin de jour début de nuit. La méthode du "crossover point" indique une étape de contrôle au niveau T.P. → 3-PGA entre 0900 et 1200 (aux 26ème et 40ème JC) et une inhibition de la PFK entre 1200 et 1800 (12ème, 26ème, 40ème JC). Pour les raisons citées précédemment, toutes précautions doivent être prises quant à ces interprétations , l'accumulation du PEP et de ses précurseurs pouvant aussi être expliquée par une faible activité de la PEPC et une forte accumulation du 3-PGA due à la photosynthèse, sans impliquer une régulation positive de l'étape T.P. → 3-PGA. Par contre la PFK pourrait être inhibée, en fin de période nocturne par le PEP, le 3-PGA, le 2-PGA (KELLY et TURNER, 1970).

C. LES LIMITES DU MODELE DE REGULATION ALLOSTERIQUE

Le modèle de COCKBURN et Mac AULAY accorde une grande importance aux variations hypothétiques des concentrations internes en CO_2 et à celles du malate et considère, de façon implicite,que les capacités de toutes les enzymes sont constantes tout au long de la période nocturne, leur activité étant modulée positivement ou négativement par la taille des pools de métabolites.

D'autre part, l'élaboration de ce type de modèle fait appel à un certain nombre de résultats obtenus *in vitro* sur des réactions isolées, résultats qui ne sont utilisés que dans la mesure où ils conviennent au modèle. Pour appuyer cette critique nous ne prendrons que deux exemples : le rôle de la concentration interne de CO_2 et le rôle du malate.

1. Le rôle du CO_2

S'il est vrai qu'à forte concentration, le CO_2 ou le bicarbonate, sont inhibiteurs de la PEPC (MUJERKI et TING, 1971), une argumentation basée sur le rôle des concentrations internes de CO_2 présente l'inconvénient de suggérer qu'il y a une régulation très fine pour la phosphorylase, combinant une activation par le CO_2 et une inhibition par le PEP, et pour la PEPC, la combinaison d'une inhibition par le CO_2 et d'une activation par le G-6-P. Le modèle suppose que durant la phase d'induction, l'activation de la phosphorylase par le CO_2 l'emporte sur l'inhibition par le PEP ce qui conduirait à une accumulation de G-6-P activant la PEPC ; durant la phase de fin d'accumulation nocturne de malate, l'inhibition de la phosphorylase par le PEP, l'emporterait sur l'activation par le CO_2, expliquant ainsi la diminution de fourniture du G-6-P à partir des glucanes. Ce type de raisonnement ignore en fait les cinétiques réelles de ces effecteurs *in vivo*, connaissance qui seule permettrait de spéculer qu'une action l'emporte sur l'autre à un moment donné. COCKBURN et coll. ont d'ailleurs montré dans un travail ultérieur (1979) que la concentration interne de CO_2, la nuit, était faible (de l'ordre de la concentration de CO_2 dans l'air ambiant) et ne montrait pas de variations significatives. Les mêmes résultats ont été obtenus chez *Sedum praealtum* par SPALDING et coll. (1979).

2. Le rôle du malate

La possibilité du rôle inhibiteur du malate est utilisée dans la littérature sur le CAM pour expliquer soit, par rétroinhibition sur la PEPC, l'arrêt de sa propre fabrication en fin de période nocturne (QUEIROZ, 1967 ; KLUGE et OSMOND, 1972), soit l'inhibition de la même enzyme durant la phase de désacidification diurne (modèle de régulation par "feedback inhibition", KLUGE et OSMOND, 1972).

Les courbes de production de malate à partir de $^{14}CO_2$ pour une situation de CAM élevé (MOREL et QUEIROZ, 1974) montrent que le maximum de synthèse se situe vers 2300, ce qui revient à dire que l'on peut considérer que l'effet

inhibiteur du malate sur la PEPC devrait commencer après 2300. Le malate est également inhibiteur de la PFK (SUTTON, 1975 c) et si on lui accorde un rôle prépondérant dans la régulation de sa propre fabrication on doit également tenir compte d'un rôle possible au niveau de la PFK ; il devient alors difficile d'expliquer comment 6 heures après le début de la période nocturne la PFK et la PEPC sont activées comme le montrent nos résultats (fig.28, représentation du crossover, intervalle 0000-0430, 40èmeJC) et ceux de COCKBURN et Mac AULAY.

Cette discussion montre que l'élaboration d'un modèle exclusivement basé sur la régulation allostérique est très difficile, du fait qu'il est rare de pouvoir vérifier les conditions et le moment où des régulations potentielles vérifiées in vitro interviennent réellement in vivo. Ceci a pu être réalisé chez *Kalanchoe blossfeldiana*, om l'on montre, par une différence de phase entre activité et capacité de la PEPC un début probable vers 2300 de l'inhibition de la PEPC par le malate, après un nombre de jours courts (60) élevé (QUEIROZ et MOREL, 1974b).

D. ELABORATION D'UN MODELE COMBINANT REGULATION ALLOSTERIQUE ET VARIATIONS JOURNALIERES DE CAPACITE ENZYMATIQUE

La régulation journalière du flux carboné entre les glucanes et le malate doit être envisagée non seulement au niveau des variations d'activités enzymatiques dues à la variation de la taille des pools de métabolites et effecteurs, mais également au niveau des variations journalières des quantités d'enzymes actives : comme nous l'avons précisé dans le premier chapitre (paragraphe C - I^{ère} partie), ce sont les deux processus assurant le fonctionnement du programme métabolique ajusté à des conditions données de l'environnement.

Comme il a déjà été indiqué (paragraphes B, C de ce chapitre), la présence de deux populations d'enzymes présentant des rythmes de niveau sensiblement identique et qui se superposent, rend le raisonnement difficile pour la situation de CAM faible, au stade actuel des possibilités de distinction entre les deux rythmes. Le modèle proposé sera donc analysé dans le cas le plus typique, et le plus intéressant, c'est-à-dire pour une situation de fonctionnement CAM élevé.

L'étude de l'organisation temporelle du fonctionnement des voies glycolytique et CAM en régime de CAM élevé a mis en évidence des "blocs fonctionnels" où enzymes et substrats oscillent respectivement en phase (fig.29). La

dynamique du fonctionnement de la glycolyse et de la voie CAM doit être envisagée sous la forme d'un niveau de base (dont la valeur dépend du degré d'induction reçu) auxquels viennent s'ajouter, à différents moments du cycle journalier, des variations oscillatoires de la capacité de transformation de substrats par les enzymes de chaque bloc. L'étude dynamique du système doit tenir compte de ce que les modifications des capacités de transformation des enzymes de chacun des blocs ne sont pas séparées dans le temps mais se chevauchent.

Ainsi, en utilisant la relation capacité enzymatique/activité enzymatique, complétée ou modulée, à certains moments du cycle, par une régulation de l'activité, effectuée par les métabolites, nous aurions, en prenant comme point de départ l'intervalle de temps fin de jour/début de nuit, le modèle suivant pour les relations entre glycolyse et voie CAM (voir fig.28 et 29).

L'augmentation concomittante de la capacité et de l'activité des enzymes du bloc 3 entraîne la diminution des pools métaboliques de ce bloc qui s'étaient accumulés en fin de période diurne. La diminution de ces pools est renforcée par une faible fourniture par les enzymes du bloc 2 dont les capacités augmentent faiblement et dont les activités sont inhibées (fig.28, intervalle 1800-0000, 40ème JC). Les métabolites du bloc 1 s'accumulent d'une part parce que la fourniture à partir des glucanes est forte, d'autre part parce que la PFK dont la capacité commence à augmenter est inhibée par la teneur initiale élevée des métabolites du bloc 3.

L'augmentation continue de capacité de la PFK et la levée progressive de son inhibition (baisse progressive des pools de métabolites du bloc 3) tendent à faire diminuer les pools de métabolites du bloc 1 ; malgré un début d'augmentation de capacité des enzymes du bloc 2, leur activité est probablement toujours inhibée, ce qui provoque une augmentation des pools de métabolites du bloc 2 et favorise l'épuisement des pools de métabolites du bloc 3.

Puis, la levée d'inhibition et l'augmentation continue de la capacité des enzymes du groupe 2 contribue à faire diminuer les pools d'intermédiaires de ce bloc, à épuiser ceux du bloc 1, dont la fourniture à partir des glucanes est faible et à augmenter ceux du bloc 3, où les enzymes et plus particulièrement la PEPC ont une faible capacité, cette dernière pouvant être inhibée par le malate qui s'est accumulé.

Dans la première moitié de la période diurne, les pools métaboliques des blocs 1 et 2 sont peu importants du fait des faibles capacités et activités des enzymes de ces deux blocs, la voie fonctionnant plutôt dans le sens de la

gluconéogenèse (pyruvate-Pi-dikinase). L'augmentation des pools d'intermédiaires du bloc 3 se poursuit du fait de la faible capacité et activité de la PEPC et d'une fourniture importante au niveau du 3-PGA par le système photosynthétique.

Dans la seconde moitié de la période diurne les pools de métabolites du bloc 3 ont atteint leur taille maximum et commencent à diminuer en fin de période diurne, car la capacité de la PEPC a commencé à augmenter dès le milieu de la période diurne tout comme son activité, la consommation du malate précédemment accumulé ayant ramené sa concentration à sa valeur minimum.

E. CONCLUSIONS

Les résultats que nous avons obtenus montrent qu'un modèle de régulation de voies métaboliques doit tenir compte :

- des modifications de capacité enzymatique qui produisent des modifications de l'activité de ces enzymes, la rythmicité circadienne de capacité tendant à produire une rythmicité circadienne des activités.

- d'une possibilité de régulation allostérique lorsque les concentrations de certains métabolites de ces voies, concentrations qui oscillent de façon circadienne, dépassent un seuil critique. La régulation allostérique module la relation de phase capacité/activité.

De plus ce modèle doit être établi dans des conditions où les paramètres de l'environnement climatique de l'organisme sont bien définis. L'élaboration d'un modèle de régulation de la glycolyse pour une situation CAM élevé devra être établi dans des conditions de photopériode (nombre de JC élevé) de thermopériode les plus favorables à l'expression du système CAM (voir l'influence de la température nocturne sur le fonctionnement des deux "fonctions terminales" que sont la respiration et la voie CAM, Chapitre I, paragraphe I-C).

Tenant compte de ces critères, on peut espérer construire un modèle de régulation à valeur adaptative en réponse aux modifications du milieu extérieur.

II

ROLE PHYSIOLOGIQUE DE L'EXCES DE CAPACITE ENZYMATIQUE

A. CONSIDERATIONS GENERALES

KREBS (1963) et WEBER et coll. (1964) ont montré que, dans une voie métabolique, les réactions dont les enzymes avaient les capacités les plus faibles avaient une forte probabilité d'être des étapes de contrôle du flux ; il est, de plus, généralement admis que les enzymes catalysant des réactions éloignées de l'équilibre thermodynamique (réactions "irréversibles") jouent un rôle prédominant dans le contrôle du flux, en comparaison des étapes proches de l'équilibre thermodynamique (réactions "réversibles"). Ces deux critères sont trop souvent considérés comme suffisants pour construire des hypothèses sur les mécanismes du contrôle du métabolisme ; en fait ils ne constituent que la première des quatre étapes (identification des enzymes impliquées dans la régulation du métabolisme, analyse de leurs propriétés cinétiques, utilisation de ces propriétés pour postuler une hypothèse de contrôle métabolique, test de l'hypothèse et modification si nécessaire) que l'on doit obligatoirement envisager (NEWSHOLME, 1965 ; NEWHSOLME et GEVERS, 1967) lorsque l'on tente une analyse des mécanismes de contrôle du métabolisme intermédiaire.

Comme, très souvent, les enzymes qui ont une faible capacité catalysent des réactions irréversibles, la confusion entre ces deux notions est fréquente dans la littérature, comme est fréquente la confusion entre mécanismes qui contrôlent la concentration en formes actives d'une enzyme donnée et mécanismes qui régulent l'activité de cette enzyme. Un certain nombre d'exemples montrent que la relation nécessaire entre faible capacité et réaction irréversible n'est pas fondée. Ainsi l'aldolase, qui a une faible capacité, catalyse une réaction réversible; ce dernier point suggérerait qu'aucun contrôle ne s'exerce à son niveau, et cependant cette enzyme peut être soupçonnée de limiter la vitesse du flux dans la gluconéogenèse à partir du fructose (SCRUTTON et UTTER, 1968) ; on peut montrer des modifications de la vitesse du flux au niveau de la G-3-PDH bien que cette enzyme ait un niveau de capacité élevé (LOWRY et coll., 1964; WILLIAMSON, 1966) ; de même KREBS (1969) et ROLLESTONE (1972) ont montré que des étapes fonctionnant à l'équilibre peuvent, dans certaines conditions, jouer un rôle régulateur.

Donc, dans le contrôle du flux métabolique on doit distinguer d'une part le rôle des capacités enzymatiques, d'autre part le rôle des activités enzymatiques.

B. L'EXCES DE CAPACITE ENZYMATIQUE ET L'AUGMENTATION DU FLUX CARBONE AVEC LE NOMBRE DE JOURS COURTS

Un des corollaires du Théorème des Sommes de KACSER et BURNS* (1963) est que, dans un système contenant un certain nombre d'enzymes, à peu près toutes les enzymes paraissent être en excès, ce qui a pour résultat que l'abaissement de quantité ou d'activité d'une d'entre elles peut avoir lieu sans effet appréciable sur le flux ; ceci revient à dire que, dans une chaîne métabolique, un des moyens d'assurer un flux maximum est le maintien d'un excès de capacité enzymatique. On montre que si toutes les concentrations en enzymes sont augmentées simultanément d'une quantité α, l'augmentation de flux prendra la valeur α. SCRUTTON et UTTER (1968) citent l'exemple d'animaux chez qui l'on peut observer, après une modification du régime alimentaire ou l'injection d'hormones, une diminution du flux de la gluconéogenèse qui s'accompagne d'une diminution des capacités des enzymes de la voie, dans un rapport qui reste celui que l'on observait avant le traitement. Après le traitement, capacité et flux augmentent dans le même rapport. Les auteurs en concluent qu'un excès adéquat de capacité est nécessaire pour que la voie métabolique assure une augmentation du flux métabolique.

Dans le système CAM l'augmentation de la fabrication du malate avec le nombre de JC peut être assimilée à une augmentation de flux ; cette augmentation s'accompagne d'une augmentation de capacité de la PEPC, qui est cor-

---

*Une fraction du changement du flux dans un système linéaire, $\delta F/F$, est le produit d'une fraction du changement d'un paramètre $\delta P/P$ (P peut être un inhibiteur et est extérieur au système) par un coefficient de réponse R.

Le coefficient de réponse R est le produit d'un coefficient de controlabilité K par un coefficient de sensibilité Z.

Le coefficient de controlabilité K est la réponse locale de la variation de la vitesse d'une étape enzymatique sur laquelle agit la variation du paramètre P ($K = (\delta V/V)/(\delta P/P)$). La réponse n'influence pas ou n'est pas influencée par le reste du système. Un exemple de coefficient de controlabilité est donné par la variation de la vitesse d'une réaction obtenue pour une très faible variation de la concentration d'un inhibiteur I, suivant que la courbe d'inhibition est du type MICHAELIS ou du type de HILL.

Le coefficient de sensibilité Z semblable au "control strenght" de HEINRICH et coll. (1977) lie la variation du flux aux variations de la concentration en enzyme d'une étape ($Z = (\delta F/F)/(\delta e/e)$). Le Théorème des Sommes, montre que la somme des coefficients de sensibilité des enzymes d'une voie métabolique est égal à 1 et l'enzyme qui dans une voie métabolique a le coefficient de sensibilité le plus élevé par rapport aux autres doit être considérée comme une enzyme de contrôle et être un "goulot" pour l'écoulement du flux. En théorie, dans une voie métabolique ne comprenant qu'une enzyme de contrôle la relation entre l'augmentation du flux et l'augmentation de concentration est proche de 1 et le Z de cette enzyme tend vers 1.

rélée avec l'augmentation de malate (QUEIROZ et MOREL, 1974) et d'une augmentation de capacité des enzymes de la glycolyse, qui est corrélée avec l'augmentation de PEPC par la loi d'allométrie. *Donc, globalement, si l'augmentation du niveau de synthèse de malate atteint après un certain nombre de JC, par rapport à ce qu'il était en JL, est assimilé à une augmentation de flux, cette augmentation est assurée par une coordination des variations d'excès de capacité enzymatique.*

C. L'EXCES DE CAPACITE ENZYMATIQUE ET LA REGULATION JOURNALIERE DU FLUX CARBONE

La validité de la mesure des oscillations journalières de capacité enzymatique a été montrée par QUEIROZ et MOREL (1974a). Nous considérerons, comme précédemment, que l'accumulation nocturne de malate à chaque photocycle nous donne une image de la variation du flux entre le début et la fin de la période nocturne. Pour la situation de CAM élevé nous avons montré qu'au sein de chaque bloc métabolique, tel que nous les avons définis (I-A-3), substrats et enzymes oscillent en phase. Pour tenter d'expliquer ceci nous nous appuierons sur les théories développées par ATKINSON(1977) qui souligne que les niveaux d'équilibre physiologique de la majorité des métabolites se situent, généralement, en dessous à la valeur $S_{(0,5)}$ des enzymes dont ils sont les substrats. Ce qui revient à dire que, *in vivo*, les enzymes catalysent les réactions au plus à 50 % de leur vitesse maximum. Si une modification externe ou interne entraîne une augmentation brusque de la concentration physiologique d'un substrat au delà du $S_{(0,5)}$ de l'enzyme, il est nécessaire, probablement pour des raisons d'ordre homéostasique, que la capacité de l'enzyme soit augmentée pour ramener la concentration du substrat au niveau du $S_{(0,5)}$ de la capacité d'enzyme modifiée: ainsi substrats et enzymes oscilleront en phase.

Les théories de KACSER et BURNS et d'ATKINSON se rejoignent donc sous la forme du problème du rôle de l'excès de capacité enzymatique. Pour les premiers, il s'agit d'un paramètre que l'on doit intégrer dans une étude du contrôle du flux ; pour ATKINSON (1969), le rôle serait de maintenir les concentrations en métabolites compatibles avec leur solubilisation dans le cytoplasme.

Ces considérations nous ont amené à tenter, à partir des seules variations de capacité enzymatique, de prévoir les variations de la taille des pools de métabolites en régime de CAM élevé durant la période nocturne, en ne raison-

nant que sur les rapports de variations de capacité des enzymes de chacun des blocs par unité de temps (fig.30). Il apparaît que le sens de variation des pools prévu théoriquement entre 1800 et 2300 et 0500 et 0900 est effectivement celui que l'on a obtenu expérimentalement, par contre, le sens de variation est contraire dans l'intervalle 2300-0500 entre les résultats théoriques et expérimentaux. Donc, les variations de concentration en enzymes, les unes par rapport aux autres, sont suffisantes pour expliquer la variation de la taille des pools de métabolites dans les tranches horaires 1800-2300 et 05000-0000 et c'est, dans la tranche 2300-0430, que l'on pourra invoquer des modifications des coefficients de controlabilité des enzymes du bloc 2 pour expliquer les variations des intermédiaires des blocs 2 et 3.

En ce qui concerne le flux global à travers la glycolyse et la voie CAM, l'augmentation relative par unité de temps sera théoriquement du type $\frac{dF}{F} = Z_1 \frac{de_1}{e_1} + Z_2 \frac{de_2}{e_2} + \ldots . Z_n \frac{de_n}{e_n}$ avec $Z_1 + Z_2 + \ldots Z_n = 1$ où e_1, e_2, $\ldots$ e_n sont les concentrations en enzymes et Z_1, Z_2, $\ldots$ Z_n les coefficients de sensibilité de chaque enzyme. En portant graphiquement la relation entre l'augmentation du flux et l'augmentation de capacité enzymatique, que l'on peut en pratique assimiler à l'augmentation de concentration en enzyme prévue dans la théorie, la pente de la droite nous donne le degré de sensibilité du flux à la variation de la capacité de chaque enzyme (fig. 31). Il apparaît :

1°) qu'entre 1100et 1700, le flux augmente moins vite que la capacité des enzymes, ce qui revient à dire que la variation relative du flux est peu sensible, dans cet intervalle de temps, à l'augmentation relative de la capacité en enzyme, donc que le Z de chaque enzyme est faible. Ceci avec la réserve que, physiologiquement, le système de fabrication du malate est sensé être ouvert, donc la courbe d'accumulation du malate, image du flux, est peut-être sous estimée ; par contre, entre 1700 et 2300, le système d'accumulation du malate est assimilable à un système fermé. La sensibilité des variations relatives du flux aux variations relatives de concentrations en enzymes augmente entre 1700 et 2300, comme le montre la valeur de Z.

2°) Il semble qu'entre 1100 et 2300, à tout moment, l'on ait $Z_{PGM} > Z_{énolase} > Z_{PFK} > Z_{PEPC}$. Ceci indiquerait que les variations relatives du flux ($\frac{\Delta [\text{ malate }]}{[\text{ malate }]}$) à travers la glycolyse et la voie CAM soient plus sensi-

aux variations relatives de la capacité de la PGM ($\frac{\Delta \text{ PGM}}{\text{PGM}}$) qu'aux variations relatives de la capacité de la PEPC ($\frac{\Delta \text{ PEPC}}{\text{PEPC}}$).

3°) La fig.31 montre également l'importance du contrôle exercé par les capacités enzymatiques sur le flux. Pour un accroissement ΔF du flux, il faut un accroissement ΔE_{PEPC} supérieur à ΔE_{PGM}, donc le contrôle exercé sur le fonctionnement de la voie est plus précis au niveau de la PEPC qu'au niveau de la PGM.

En résumé, la variation relative du flux métabolique en réponse à une faible variation relative de la capacité d'une enzyme traduira le degré de sensibilité de la voie à cette enzyme ; par contre la précision du contrôle et le degré d'homéostasie attachés à une enzyme seront d'autant plus élevés qu'une large variation de la capacité sera nécessaire pour provoquer un changement de flux.

Ceci, qui n'est bien entendu qu'une ébauche du rôle de la capacité enzymatique, semble indiquer qu'un modèle de régulation d'une voie métabolique devra tenir compte non seulement des mécanismes de régulation de l'activité enzymatique par des effecteurs (coefficient de controlabilité) mais aussi de l'action des variations de capacité en valeur relative (coefficient de sensibilité) et en valeur absolue (contrôle).

CONCLUSIONS GENERALES

Nous proposons que toute tentative d'élaboration d'un modèle de la régulation adaptative d'une partie du réseau métabolique chez les plantes CAM tienne compte des effets conjugués des modifications de l'environnement climatique et de l'environnement biochimique sur la voie métabolique étudiée.

I. Détermination des effets des paramètres de l'environnement climatique

1°) La première étape consiste à déterminer l'effet de la variation du paramètre (la photopériode) sur le système métabolique étudié (glycolyse et voie CAM) sous l'angle de la *variation saisonnière*. Il faut déterminer la "saison" (rapport longueur du jour/longueur de la nuit) pour laquelle le système s'exprime à son niveau minimum et à son niveau maximum et suivre les modifications résultant du passage d'une saison à l'autre.

Le changement de photopériode a provoqué chez le *Kalanchoe blossfeldiana* :

. une réponse à l'échelle de la saison, que nous qualifierons de *réponse à court terme*, qui suit immédiatement le changement du paramètre de l'environnement. Cette réponse est caractérisée par une baisse de la capacité de certaines enzymes dans les premiers Jours Courts suivie d'une phase de latence où l'on a peu de différences avec la situation de Jours Longs en ce qui concerne les niveaux de capacité enzymatique et les phases des oscillations circadiennes des capacités et de la taille des pools.

. une *réponse à long terme* résultant de la permanence de la modification de l'environnement sous la forme globale d'une augmentation exponentielle des capacités des enzymes de la voie CAM et de la glycolyse. Seule cette réponse doit être considérée comme une réponse ayant valeur adaptative.

2°) La seconde étape consiste à étudier les *variations journalières* des composantes du système métabolique (enzymes, substrats) dans les conditions de l'environnement correspondant à l'une ou l'autre des "saisons" critiques.

De même, il sera nécessaire de distinguer la *réponse à court terme*, à l'échelle de la journée, que l'on obtient au niveau du passage lumière/obscurité sous la forme d'un réajustement des capacités enzymatiques, de la *réponse à long terme* due à la permanence de la période de lumière ou d'obscurité consistant en un réajustement plus lent sous la forme d'oscillations de capacité ou de taille de pools de métabolites.

Ces considérations impliquent que l'expérimentateur doit être capable de replacer à tout moment son expérimentation dans le cadre de l'histoire de l'organisme en dissociant les réponses à court terme et les réponses à long terme dues aux modifications d'un paramètre de l'environnement.

II. Détermination des effets des paramètres de l'environnement biochimique

1°) A *l'échelle de la saison* nous avons montré la présence de deux populations actives, l'une surtout pendant la période diurne du cycle, l'autre surtout pendant la période nocturne du cycle de 24 heures, pour chaque enzyme étudiée. La permanence d'une nouvelle condition de l'environnement (JC) provoque l'augmentation du niveau de fonctionnement des populations actives durant la période nocturne du cycle. Ces augmentations sont coordonnées, pour la plupart des enzymes, par une loi d'allométrie. De plus,des voies métaboliques connectées à la glycolyse et à la voie CAM (voie des polyphénols, voie des acides tricarboxyliques) sont également modifiées dans leur niveau de fonctionnement en réponse au changement du paramètre du climat. Ces modifications de l'environnement biochimique sont le signe d'une coordination de la modification du fonctionnement de l'ensemble du réseau métabolique en réponse à une modification d'un paramètre de l'environnement.

2°) A *l'échelle de la journée* nous avons montré une capacité de la part de l'organisme à mesurer l'intervalle de temps qui sépare les signaux "début de jour" et "début de nuit" qui déterminent, selon leur position sur le cycle de 24 heures, "la saison". Cette aptitude qui permet à l'organisme de situer la nouvelle information (la modification du paramètre de l'environnement) par rapport à celle précédemment reçue, lui permet d'enclencher une série de modifications conduisant à l'établissement d'un nouveau programme physiologique . Les modifications apparaissent sous la forme d'une augmentation du nombre de points de contrôle le long de la voie de la glycolyse et de la voie CAM que nous avons déterminé par la mise en évidence de blocs enzymatiques fonctionnels.

Tenant compte de la relation: "le rythme de capacité enzymatique commande le rythme d'activité enzymatique qui, à son tour détermine le rythme des pools de métabolites", nous avons montré l'importance des variations des pools de métabolites qui selon l'heure du cycle journalier ont la capacité ou non de jouer un rôle régulateur. A cette régulation par les variables du système métabolique s'ajoute un contrôle par les paramètres du système que sont les capacités enzymatiques, l'ensemble assurant une régulation séquentielle le long des deux voies métaboliques étudiées.

BIBLIOGRAPHIE

ASCHOFF, J., 1965. Circadian clocks. North Holland Publishing Company, Amsterdam.

ATKINSON, D.E., 1969. Limitation of metabolic concentrations and the conservation of solvent capability of the cell. *Curr.Top.Cell.Regul.*, 1, 29-43.

ATKINSON, D.E., 1977. Cellular energy metabolism and its regulation. Academic Press. New York, San Francisco, London.

BALSA, C., ALIBERT, G., BRULFERT, J., QUEIROZ, O., BOUDET, A.M., 1979. Photoperiodic control of phenolic metabolism in *Kalanchoe blossfeldiana*. *Phytochemistry*, 18, 1159-1163.

BANDURSKI, R.S., GREINER, C.M., 1953. The enzymatic synthesis of oxaloacetate from phosphenolpyruvate and carbon dioxide. *J.Biol.Chem.*, 27, 137-150.

BEEVERS, H., GIBBS, M., 1954. The direct oxidation pathway in plant respiration. *Plant Physiol.*, 29, 322-324.

BERGMEYER, H.U., 1965. Methods of enzymatic analysis. Weinheim : Chemie. Academic Press, New York, London.

BUCHANAN-BOLLIG, I.C., KLÜGE, M., LUTTGE, U. 1980. PEP-Carboxylase activities and the regulation of CAM : effects of extraction procedures and leaf age. *Z.Pflanzenphysiol.*, 97, 457-470.

BUKOWIECKI, A.C., ANDERSON, L.E., 1974. Multiple forms of aldolase and triose phosphate isomerase in diverse plant species. *Plant Sci.Lett.*, 3, 381-386.

BRULFERT, J., GUERRIER, D., QUEIROZ, O., 1973. Photoperiodism and enzyme activity : balance between inhibition and induction of the Crassulacean Acid Metabolism. *Plant Physiol.*, 51, 220-222.

BRULFERT, J., GUERRIER, D., QUEIROZ, O., 1975. Photoperiodism and enzyme rhythms: kinetic characteristics of the photoperiodic induction of Crassulacean Acid Metabolism. *Planta*, 125, 33-44.

BRULFERT, J., IMHOFF, C., FONTAINE, D., 1976. Etude comparative de l'induction photopériodique aux niveaux morphogénétique et métabolique. In: Hommage au Professeur P. CHOUARD. JACQUES, R. Ed., Paris, 443-455.

BRULFERT, J., ARRABACA, M.C., GUERRIER, D., QUEIROZ, O., 1979. Changes in the isozymic pattern of phosphoenolpyruvate carboxylase. An early step in photoperiodic control of Crassulacean Acid Metabolism level. *Planta*, 146, 129-133.

DELEENS, E., GARNIER-DARDART, J., QUEIROZ, O., 1979. Carbon isotope of intermediates of the Starck-Malate sequence and level of the Crassulacean Acid Metabolism in leaves of *Kalanchoe blossfeldiana* Tom Thumb. *Planta*, 146, 441-449.

DITTRICH, P., CAMPBELL, W.H., BLACK, C.C., 1973. Phosphoenolpyruvate carboxykinase in plants exhibiting Crassulacean Acid Metabolism. *Plant Physiol.*, 52, 327-361.

DUGGLEBY, R.G., DENNIS, D.T., 1974. Nicotinamide adenine dinucleotide specific glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Pisum sativum*. Purification and characterization. *J.Biol.Chem.*, 249, 162-166.

GOODWIN, B.C., 1963. Temporal organization in cells. Academic Press, London.

GREGORY, F.G., SPEAR, I., THIMANN, K.V., 1954. The interrelation between CO_2 metabolism and photoperiodism in *Kalanchoe*. *Plant Physiol.*, 29, 220-229.

GHOSH, A., CHANCE, B., 1964. Oscillations of glycolytic intermediates in yeast cells. *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, 16, 174-181.

GOATLY, M.B., COOMBS, J., SMITH, H., 1975. Development of C_4 photosynthesis in sugar cane : changes in properties of phosphoenolpyruvate carboxylase during greening. *Planta*, 125, 15-24.

HAIDRI, Z.A., 1955. Incorporation of malic acid-2-^{14}C and pyruvic acid-2-^{14}C into starch. *Plant Physiol.*, 30, suppl. IV.

HALBERG, F., REINBERG, A., 1967. Rythmes circadiens et rythmes de basses fréquences en physiologie humaine. *J.Physiol.*, 59, 117-200.

HALBERG, F., TONG, Y.L., JOHNSON, E.A., 1967. Circadian system phase : an aspect of temporal morphology. Procedure and illustrative examples. In : The Cellular Aspects of Biorhythms. Springer Verlag, Berlin, 20-48.

HEINRICH, R., RAPOPORT, S.M., RAPOPORT, T.A., 1977. Metabolic regulation and mathematical modelling. *Prog.Biophys.Mol.Biol.*, 32, 1-82.

HERBERT, M., BURKHARD, Ch., SCHNARRENBERGER, C., 1979. A survey for isoenzymes of glucosephosphate isomerase, phosphoglucomutase, glucose-6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase in C_3-, C_4- and Crassulacean-Acid-Metabolism plants, and Green Algae. *Planta*, 145, 95-104.

CHANCE, B., HOLMES, W., HIGGINS, J.J., CONNELLY, C.M., 1958. Localisation of interaction sites in multicomponent transfer system : theorems derived from analogues. *Nature*, 181, 1190-1193.

CHATUVERDI, S.N., ZABKA, G., 1977a. Studies on dark fixation of carbon dioxide in *Kalanchoe*. I. Effect of water stress and growth retardants. *Ann. Bot.*, 41, 493-500.

CHATUVERDI, S.N., ZABKA, G., 1977b. Studies on dark fixation of carbon dioxide in *Kalanchoe*. II. Effect of interaction of photoperiodic induction with water stress and growth retardants. *Ann.Bot.*, 41, 501-505.

COCKBURN, W., Mac AULAY, A., 1977. Changes in metabolite levels in *Kalanchoe daigremontiana* and the regulation of malic acid accumulation in Crassulacean Acid Metabolism. *Plant Physiol.*, 59, 455-458.

COCKBURN, W., TING, I.P., STERNBERG, L.O., 1979. Relationships between stomatal behavior and internal carbon dioxide concentration in Crassulacean Acid Metabolism plants. *Plant Physiol.*, 63, 1029-1032.

CREWS, C.E., WILLIAMS, S.L., VINES, H.M., BLACK, C.C., 1976. Changes in the metabolism and physiology of Crassulacean Acid Metabolism plants growth in controlled environments. In : CO_2 metabolism and plant productivity. BURRIS, R.H., BLACK, C.C. , Eds., Baltimore, London, Tokyo : University Park Press, 235-250.

DAAN, S., PITTENDRIGH, C.S., 1976. A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents. II. The variability of phase response curves. *J.Comp.Physiol.*, 106, 253-266.

DELEENS, E., 1980. Fractionnement des isotopes stables du carbone lors des carboxylations végétales : Etude de la flexibilité du Métabolisme Acide Crassulacéen et mise en évidence d'une compartimentation fonctionnelle de la séquence Amidon-Malate chez *Bryophyllum daigremontianum* et chez *Kalanchoe blossfeldiana* "Tom Thumb". Thèse de Doctorat d'Etat Sc.Nat., Univ. Paris-Sud, Centre d'Orsay, N° 2241 , 124 p.

DELEENS, E., GARNIER-DARDART, J., 1977. Carbon isotope composition of biochemical fractions isolated from leaves of *Bryophyllum daigremontianum* Berger, a plant with Crassulacean Acid Metabolism : some physiological aspects related to CO_2 dark fixation. *Planta*, 135, 241-248.

HUXLEY, J.S., TESSIER, G., 1936. Terminologie et notation dans la description de la croissance relative. *C.R.Soc.Biol.*, 121, 934-936.

KACSER, H., BURNS, J.A., 1973. The control of flux. *Symp.Soc.Exp.Biol.*, 27, 65-104.

KAPLAN, A., GALE, J., POLJAKOFF-MAYER, A., 1976. Resolution of net dark fixation of carbon dioxide into its respiration and grass dark fixation components in *Bryophyllum daigremontianum*. *J.Exp.Bot.*, 97, 220-230.

KELLY, G.J., LATZKO, E., 1975. Evidence for phosphofructokinase in chloroplasts. *Nature*, 256, 429-430.

KELLY, G.J., LATZKO, E., 1977. Chloroplast phosphofructokinase. I. Proof of phosphofructokinase activity in chloroplasts. *Plant Physiol.*, 60, 290-294.

KELLY, G.J., TURNER, J.F., 1968. Inhibition of pea seed phosphofructokinase by phosphoenolpyruvate. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, 30, 195-199.

KELLY, G.J., TURNER, J.F., 1969. The regulation of pea seed phosphofructokinase by phosphoenolpyruvate. *Biochem.J.*, 115, 481-487.

KELLY, G.J., TURNER, J.F., 1970. The regulation of pea seed phosphofructokinase by 6-phosphogluconate, 3-phosphoglycerate, 2-Phosphoglycerate and phosphoenol pyruvate. *Biochim.Biophys.Acta*, 208, 360-367.

KLUGE, M., 1969. Zür Analyse des CO_2-Austausches von *Bryophyllum* .II. Hemmung des nachtlichen Stärkeabbaus in CO_2 verarmter Atmosphäre. *Planta*, 86, 142-150.

KLUGE, M., OSMOND, C.B., 1971. Pyruvate-Pi-dikinase in Crassulacean Acid Metabolism. *Naturwissenschaften*, 58, 414-415.

KLUGE, M., OSMOND, C.B., 1972. Studies on phosphoenol pyruvate carboxylase and other enzymes of Crassulacean Acid Metabolism of *Bryophyllum tubiflorum* and *Sedum praealtum*. *Z.Pflanzenphysiol.*, 66, 97-105.

KLUGE, M., TING, I.P., 1978. Crassulacean Acid Metabolism : analysis of an ecological adaptation. In : Ecological studies, 30. BILLINGS, W.D., GOLLEY, F., LANGE, O., OLSON, J.S., Eds., Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag.

KLUGE, M., LANGE, O.L., Von EICHMANN, M.SCHMIDT, R., 1973. Diurnaler Saürerhythmus bei *Tillandsia usneoïdes* : Untersuchungen über den Weg des Kohlenstoffs sowie die Abhängigkert des CO_2-Gaswechsels vorr Lichtintensität, temperatur und wassergehalt der Pflanze. *Planta*, 112, 357-372.

KLUGE, M., BLEY, L., SCHMID, R., 1975. Malate synthesis in Crassulacean Acid Metabolism (CAM) via a double CO_2 dark fixation ? In : Environmental and Biological Control of Photosynthesis. MARCELLE, R., Ed., The Hague, Dr. W.JUNG b.v. Publishers, 281-288.

KREBS, H.A., 1963. Renal gluconeogenesis. *Advan.Enz.Regul.*, 1, 385-400.

KREBS, H.A., 1969. The role of equilibria in the regulation of metabolism. *Curr.Top.Cell.Regul.*, 1, 45-55.

LATZKO, E., GIBBS, M., 1968. Distribution and activity of enzymes of reductive pentose phosphate cycle in spinach leaves and in chloroplasts isolated by different methods. *Z.Pflanzenphysiol.*, 59, 184-194.

LERMAN, J.C., QUEIROZ, O., 1974. Carbon fixation and isotope discrimination by a crassulacean plant : dependance on photoperiod. *Science*, 183, 1207-1209.

LIBBERT, E., 1976. Kompendium der allgemeinen Biologie. Stuttgart, New York, G.Fisher Verlag.

LOWRY, O.H., PASSONNEAU, J.V., HASSELBERGER, F.X., SCHULZ, D.W., 1964. Effect of ischemia in known substrates and cofactors of the glycolytic pathway in brain. *J.Biol.Chem.*, 239, 18-30.

MARCELLE, R., 1975. Effect of photoperiod in the CO_2 and O_2 exchanges in leaves of *Bryophyllum daigremontianum* (Berger). In : Environmental and Biological Control of Photosynthesis. MARCELLE, R., Ed., The Hague : Dr. W.JUNK b.v. Publishers, 349-356.

MILBURN, T.R., PEARSON, D.J., NOEGWE, N.A., 1968. Crassulacean Acid Metabolism under natural tropical conditions. *New Phytol.*, 67, 883-897.

MOREL, C., 1979a. Rôle coordinateur du CAM dans le métabolisme intermédiaire. I. Fonction anaplérotique de l'enzyme malique et cycle des acides tricarboxyliques. *Physiol.Vég.*, 17, 697-712.

MOREL, C., 1979b. Rôle coordinateur du CAM dans le métabolisme intermédiaire. II. Photopériode et voies de synthèse des acides aminés. *Physiol.Vég.*, 17, 713-730.

MOREL, C., QUEIROZ, O., 1974. Physiological significance of endogenous enzymic rhythms in the PEP Carboxylase pathway of CO_2 fixation in CAM plants. *J.Interdiscipl.Cycle Res.*, 5, 206-216.

MOREL,C., CELATI, C., QUEIROZ, O., 1972. Sur le Métabolisme Acide des Crassulacées. V. Adaptation de la capacité enzymatique aux changements de photopériode (métabolisme de l'acide malique et transaminations) . *Physiol.Vég.*, 10, 743-763.

MOREL, C., VILLANUEVA, V.R., QUEIROZ, O., 1980. Are polyamines involved in the induction and regulation of the Crassulacean Acid Metabolism ? *Planta*, 149, 440-444.

MUKERJI, S.K., TING, I.P., 1968. Malate dehydrogenase (decarboxylating)(NADP) isoenzymes of *Opuntia* stem tissue. Mitochondria, chloroplast, and soluble forms. *Biochem.Biophys.Acta*, 167, 239-249.

MUKERJI, S.K., TING, I.P., 1969. Malic dehydrogenase isoenzymes in green stem tissue of *Opuntia*: isolation and characterization. *Arch.Biochem.Biophys.*, 131, 336-351.

MUKERJI, S.K., TING, I.P., 1971. Phosphoenol pyruvate carboxylase isoenzymes : separation and properties of three forms from cotton leaf tissue. *Arch.Biochem.Biophys.*, 143, 297-317.

MURPHY, D.J., LEECH, R.M., 1978. The pathway of ^{14}C bicarbonate incorporation into lipids in isolated photosynthetising spinach chloroplasts. *FEBS lett.*, 88, 192-196.

NEALES, T.F., 1975. The gas exchange pattern of CAM plants. In : Environmental and Biological Control of Photosynthesis. MARCELLE, R., Ed., The Hague: Dr. W.JUNK b.v. Publishers, 299-310.

NEWSHOLME, E.A., 1965. Regulation of enzyme activity. *Sci.Prog.*, 53, 237-285.

NEWSHOLME, E.A., GEVERS, W., 1967. Control of glycolysis and gluconeogenesis in liver and kidney cortex. *Vita.Horm.*, 25, 1-87.

NOSE, A., SHIROMA, M., MIYAZATO, K., MURAYAMA, S., 1977. Studies on matter production in pineapple plants. I. Effects of light intensity in light period on CO_2 exchange and CO_2 balance of pinneapple plants. *Jap.J.Crop.Sci.*, 46, 579-587.

OSMOND, C.B., 1976. CO_2 assimilation and dissimilation in the light and dark in CAM plants. In : CO_2 Metabolism and Plant Productivity. BURRIS, R.H., BLACK, C.C., Eds., Baltimore, London, Tokyo : University Park Press, 217-233.

OSMOND, C.B., 1978. Crassulacean Acid Metabolism : a curiosity in context. *Ann.Rev.Plant Physiol.*, 29, 379-414.

OSMOND, C.B., ALLAWAY, W.G., SUTTON, B.G., TROUGHTON, J.H., QUEIROZ, O., LÜTTGE, U., WINTER, K., 1973. Carbon isotope discrimination in photosynthesis of CAM plants. *Nature*, 246, 41-42.

PIERRE, J.N., QUEIROZ, O., 1972. Action du photopériodisme sur l'activité de la 3-phosphoglyceraldehyde deshydrogénase (NAD) en liaison avec le Métabolisme Acide des Crassulacées. *C.R.Acad.Sc.*, Paris, 275, 2881-2884.

PIERRE, J.N., QUEIROZ, O., 1979. Regulation of glycolysis and level of the Crassulacean Acid Metabolism. *Planta*, 144, 143-151.

PITTENDRIGH, C.S., 1954. On temperature independance in the clock system controlling emergence in *Drosophila*. *Proc.Natl.Acad.Sci.* USA, 40, 1018-1029.

PITTENDRIGH, C.S., 1960. Circadian rhythms and the circadian organization of living systems. *Cold Spr.Harb.Symp.Quant.Biol.*, 25, 159-184.

PITTENDRIGH, C.S., 1965. On the mechanism of the entrainment of a circadian rhythm by light cycles. In : Circadian Clocks ASCHOFF, J. ed., North Holland Publishing Company, Amsterdam, 277-297.

PITTENDRIGH, C.S., DAAN, S., 1976. A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal nodents. IV. Entrainment : pacemaker as clock. *J. Comp.Physiol.*, 106, 291-331.

QUEIROZ, O., 1965. Sur le Métabolisme Acide des Crassulacées. Action à long terme de la température de nuit sur la synthèse d'acide malique par *Kalanchoe blossfeldiana* "Tom thumb" placé en Jours Courts. *Physiol. Vég.*, 3, 203-213.

QUEIROZ, O., 1966. Sur le Métabolisme Acide des Crassulacées. II. Action à long terme de la température de jour sur les variations de teneur en acide malique en Jours Courts. *Physiol.Vég.*, 4, 323-339.

QUEIROZ, O., 1967. Recherche d'un modèle enzymatique pour le déterminisme de la désacification diurne chez les Crassulacées. *C.R.Acad.Sci.* Paris, 265, 1928-1931.

QUEIROZ, O., 1968. Sur le Métabolisme Acide des Crassulacées. III. Variation d'activité enzymatique sous l'action du photopériodisme et du thermopériodisme. *Physiol.Vég.*, 6, 117-136.

QUEIROZ, O., 1969. Photopériodisme et activité enzymatique (PEP carboxylase et Enzyme malique) dans les feuilles de *Kalanchoe blossfeldiana*. *Phytochemistry*, 8, 1655-1663.

QUEIROZ, O., 1970. Sur le Métabolisme Acide des Crassulacées. IV. Réflexions sur les phénomènes oscillatoires au niveau enzymatique et sur la compartimentation métabolique sous l'action du photopériodisme. *Physiol.Vég.*, 8, 75-110.

QUEIROZ, O., 1974. Circadian rhythms and metabolic patterns. *Ann.Rev.Plant Physiol.*, 25, 115-134.

QUEIROZ, O., 1975. Rhythmical characteristics at different levels of CAM regulation : physiological and adaptative significance. In: Environmental and Biological Control of Photosynthesis. MARCELLE, R., Ed., The Hague : Dr. W.JUNK, b.v. Publishers, 357-368.

QUEIROZ, O., 1976. Chronobiologie du système CAM: les rythmes de capacité enzymatique sont-ils des mécanismes régulateurs ? *Physiol.Vég.*, 14, 629-639.

QUEIROZ, O., 1979a. Problématique de la modélisation des systèmes rythmiques complexes couplés avec des périodismes du climat. In : Elaboration et justification des modèles,applications en biologie. Tome II. MALOINE, S.A., Ed., Paris, 581-591.

QUEIROZ, O., 1979b. CAM : Rhythms of enzyme capacity and activity as adaptative control mechanisms. In : Photosynthesis II, Encyclopedia of Plant Physiology (new series), GIBBS, M., LATZKO, E., Ed., Berlin, Heidelberg, New York : Springer Verlag, 126-139.

QUEIROZ, O., BRULFERT, J., 1975. Metabolic timer: Relationships between photoperiodic, enzymic circadian rhythms and feedback control of the malate pathway in the Crassulacean Acid Metabolism. In : Proceedings of the XIIth International Conferences, International Society of Chronobiology, Washington D.C., HAYES, D.K., Ed., The Publishing House "Il Ponte", Milano, 311-319.

QUEIROZ, O., MOREL, C., 1974a. Photoperiodism and Enzyme Activity. Toward a model for the control of circadian metabolic rhythms in the Crassulacean Acid Metabolism. *Plant Physiol.*, 53, 596-602.

QUEIROZ, O., MOREL, C., 1974b. Metabolic feedback and endogenous circadian rhythmicity : the case of the enzyme PEP carboxylase. *J.Interdiscipl. Cycle Res.*, 5, 217-222.

RANSON, S.L., THOMAS, M., 1960. Crassulacean Acid Metabolism. *Ann.Rev.Plant Physiol.*, 11, 81-110.

ROLLESTON, F.S., 1972. A theoritical background to the use of measured concentrations of intermediates in study of the control of intermediary metabolism. *Curr.Top.Cell.Regul.*, 5, 47-75.

SCRUTTON, M.C., UTTER, M.F., 1968. The regulation of glycolyses and gluconeogenesis in animal tissues. *Ann.Rev.Bioch.*, 37, 249-302.

SLACK, C.R., HATCH, M.D., GOODCHILD, D.J., 1969. Distribution of enzyme in mesophyll and parenchyma-sheath chloroplasts of maize leaves in relation to the C_4-dicarboxylic acid pathway of photosynthesis. *Biochem. J.*, 114, 489-498.

SPALDING, M.H., STUMPF, D.K., KU, M.S., BURRIS, R.H., EDWARDS, G.E., 1979. Crassulacean Acid Metabolism and diurnal variations of internal CO_2 and O_2 concentrations in *Sedum praealtum* D.C. *Aust.J.Plant Physiol.*, 6, 557-567.

SUCIYAMA, T., LAETSCH, W.M., 1975. Occurence of pyruvate-Pi-dikinase in the succulent plant, *Kalanchoe daigremontiana* Hamet et Perrier. *Plant Physiol.*, 56, 605-607.

SUTTON, B.G., 1975a. The path of carbon in CAM plant at night. *Aust.J.Plant Physiol.*, 2, 377-387.

SUTTON, B.G., 1975b. Glycolysis in CAM plants. *Aust.J.Plant Physiol.*, 2, 389-402.

SUTTON, B.G., 1975c. Kinetic properties of phosphorylase and 6-phosphofructokinase of *Kalanchoe daigremontiana* and *Atriplex spongiosa*. *Aust.J. Plant Physiol.*, 2, 403-411.

SZAREK, S.R., TING, I.P., 1974a. Seasonal patterns of acid metabolism and gaz exchange in *Opuntia basilaris*. *Plant Physiol.*, 54, 76-81.

SZAREK, S.R., TING, I.P., 1974b. Respiration and gaz exchange in stem tissue of *Opuntia basilaris*. *Plant Physiol.*, 54, 829-834.

TESSIER, G., 1948. La relation d'allométrie, sa signification statistique et biologique. *Biometrics*, , 14-53.

TING, I.P., 1971. Non autotrophic CO_2 fixation and Crassulacean Acid Metabolism. In : Photosynthesis and photorespiration. HATCH, N.D., OSMOND, C.B., Eds., New York: Wiley-Interscience, 169-185.

TING, I.P., 1976. Crassulacean Acid Metabolism in natural ecosystems in relation to annual CO_2 uptake patterns and water utilization. In : CO_2 Metabolism and Plant Productivity. BURRIS, R.H., BLACK, C.C., Eds., Baltimore, London, Tokyo : University Park Press, 205-216.

TING, I.P., OSMOND, C.B., 1973. Activation of plant P-enolypruvate carboxylase by glucose-6-Phosphate : a particular role in Crassulacean Acid Metabolism. *Plant.Sci.Lett.*, 1, 123-128.

VICKERY, H.B., 1952. The behavior of isocitric acid in excised leaves of *Bryophyllum calycinum* during culture in alterning light and darkness. *Plant Physiol.*, 27, 9-17.

VICKERY, H.B., 1954. The effect of abnormally prolonged alternating periods of light and darkness upon the composition of *Bryophyllum calycinum* leaves. *Plant Physiol.*, 29, 520-526.

VIDAL, J., CAVALIE, G., GADAL, P., 1976. Etude de la phosphoénol pyruvate carboxylase du haricot et du sorgho par électrophorèse sur gel de polyacrilamide. *Plant Sci.Lett.*, 7, 265-270.

WALKER, D.A., 1956. Malate synthesis in a cell-free extract from a Crassulacean plant. *Nature*, 178, 593-594.

WALKER, D.A., 1957. Physiological studies in acid metabolism in green plants. *Biochem.J.*, 67, 73-79.

WALKER, D.A., BROWN, J.M.A., 1957. Physiological studies on acid metabolism. 5. Effects of carbon dioxide concentration on phosphoenol pyruvate carboxylase activity. *Biochem.J.*, 67, 79-83.

WEBER, G., SINGMAL, R.L., STAMM, N.B., FISHER, E.A., MENTENDIEK, M.E., 1964. Regulation of enzymes involved in gluconeogenesis. *Advan.Enz.Regul.*, 2, 1-38.

WILLIAMSON, J.R., 1966. Glycolytic control mechanisms. Kinetics of intermediate changes during the aerobic-anoxic transition in perfused rat heart. *J.Biol.Chem.*, 241, 5026-5035.

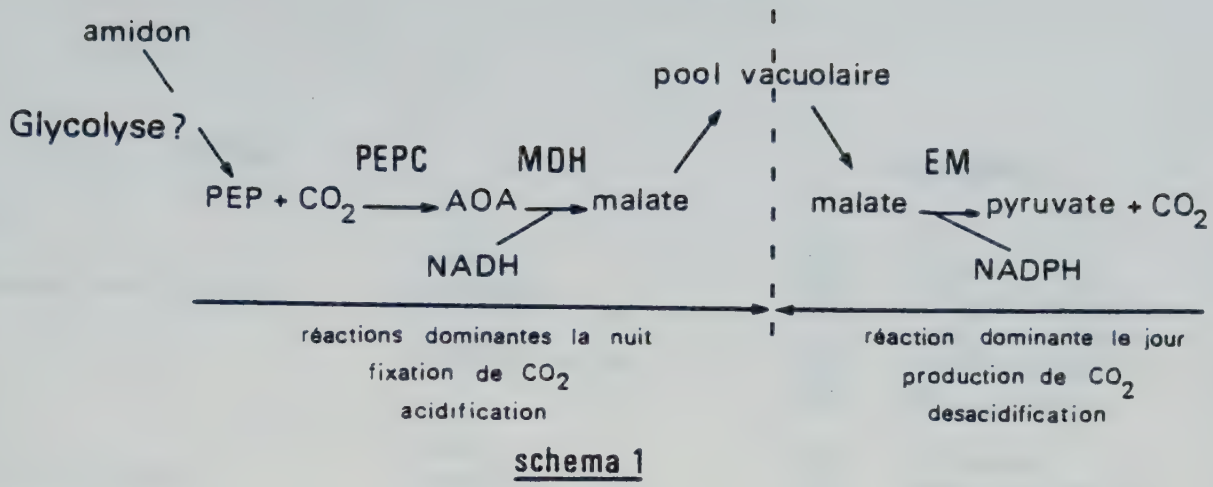
WILKINS, M.B., 1959. An endogenous rhythm in the rate of CO_2 output of *Bryophyllum*. I. Some preliminary experiments. *J.Expt.Bot.*, 10, 377-390.

WILKINS, M.B., 1965. The influence of temperature and temperature changes on biological clocks. In : Circadian Clocks. ASCHOFF, J., Ed. , North-Holland, Amsterdam, 146-163.

WILKINS, M.B., 1969. Circadian rhythms in plants. In : Physiology of plant growth and development. WILKINS, M.B., Ed., London : Mc Graw-Hill, 647-671.

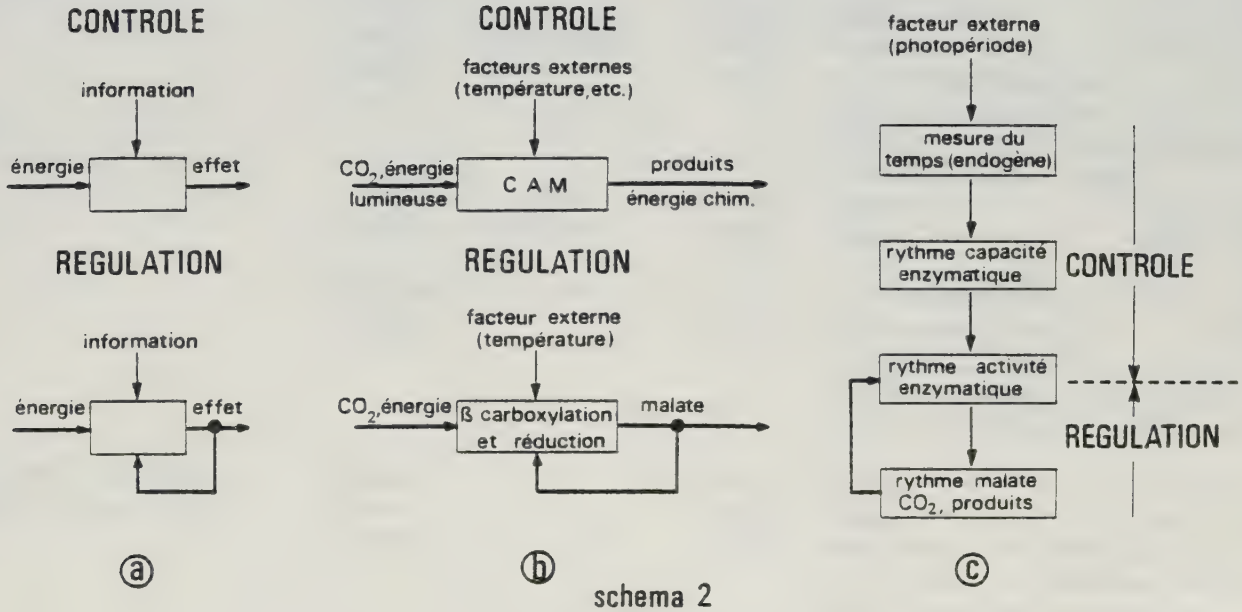
WINTER, K., LUTTGE, V., WINTER, E., TROUGHTON, J., 1978. Seasonal shift from C_3 photosynthesis to Crassulacean Acid Metabolism in *Mesembryanthemum crystallinum* growing in its natural environment. *Oecologia*, 34, 225-237.

WOLF, J., 1960. Der diurnale Saurerhythmus. In : Encyclopedia of Plant Physiology. RUHLAND, W., Ed., Vol.12, Berlin, Heidelberg, New York : Springer. 809-889.



schema 1

Fonctionnement temporel de la voie CAM



schema 2

2a - Contrôle et régulation selon LIBERT (1976)

2b - Contrôle et régulation pour le CAM selon KLUGE et TING (1978)

2c - Contrôle et régulation pour le CAM expliciant l'organisation temporelle rythmique relativement au facteur périodique externe (photopériode)

TABLEAU I

RYTHMES	REFERENCES				
Mouvement des pétales	BUNSON	1953	Planta	42	p.220
	SCHREMPF	1977	J.Interdisciplinary Cycle Res.	8	p.346
	ENGELMAN et col.	1977	Chronobiologia	IV	p.109
		1978	Plant Physiol.	43	p. 68
Induction florale	CARR	1952	Z.f.Naturf.	76	p.570
	SCHWABE	1955	Physiol.Plantarum	8	p.263
	BUNNING et ENGELMAN	1960	Naturwiss.	47	p.332
	ENGELMAN	1960	Planta	55	p.496
Mouvement des stomates	SCHWABE	1952	Nature	169	p.1053
	NISHIDA	1963	Physiol.Plant.	16	p.281
	KLUGE et FISCHER	1967	Planta	77	p.212
Pression osmotique	LUTTGE et col.	1975	Plant Physiol.	56	p.613
Respiration	SCHMITZ	1951	Planta	39	p.271
CO_2(fixation, dégagement, point de compensation)	WILKINS	1959	J.Expt.Bot.	10	p.337
	WARREN et WILKINS	1961	Nature	191	p.686
	QUEIROZ	1970	Physiol.Vég.	8	p. 75
	JONES et MANSFIELD	1972	Planta	103	p.194
	OSMOND	1976	CO_2 metabolism and plant productivity. BURRIS et BLACK eds. Baltimore University Park Press		p. 217
	HARRIS et WILKINS	1976	Planta	129	p.253
	HARRIS et WILKINS	1978	Planta	138	p.271
O_2	BRUNNHOFER et col.	1968	Z.Pflanzenphysiol.	59	p.285
	MARCELLE	1975	Environment and biological control of photosynthesis MARCELLE ed. The Hague. Dr. JUNK publisher		p.349
acide malique (acidification, désacidification)	BECKER	1953	Planta	43	p.1
	KLUGE	1968	Planta	88	p.359
	SUTTON	1974	Regulation of carbohydrate metabolism in succulent plants. Thèse Aust.Nat.University		
	LUTTGE et BALL	1977	Oecologia	31	p.85
	KENYON et col.	1978	FEBS letter	94	p.281
ions (Na^+, K^+, Cl^-)	BLOOM	1979	Plant Physiol.	64	p.919
	DIALLO	1980	Adaptation du métabolisme à la présence de Nacl. Thèse de 3e cycle. Paris VI.		

TABLEAU I (suite)

Métabolites autres que l'acide malique					
amidon	PUSCHER et col.	1949	Plant Physiol.	24	p.610
	VICKERY	1952	Plant Physiol.	27	p.9
	VICKERY	1954	Plant Physiol.	29	p.520
glucose-saccharose	VICKERY	1952	Plant Physiol.	27	p.9
glucose-6-P, fructose 6-P fructose 1-6 biP, T.P., 3 PGA 2 PGA, PEP	PIERRE et QUEIROZ	1979	Planta	144	p.143
pyruvate,citrate,isocitrate*	VICKERY*	1952	Plant Physiol.	27	p.9
α cetoglutarate,succinate	MOREL	1979	Physiol.Vég.	17	p.697
aspartate,glutamate,glycine serine,glutamine,alanine, asparagine,arginine	MOREL	1979	Physiol.Vég.	17	p.713
glycérate et Rub-5-P	KLUGE	1969	Planta	85	p.160
Enzymes					
phosphatases	EHRENBERG	1954	Planta	43	p.528
	SANWALL et KRISMNAN	1960	Nature	188	p.664
PFK,aldolase* ,G-3-PDH	SANWALL et KRISMNAN*	1960	Nature	188	p.664
PGM, énolase, PEPC	PIERRE et QUEIROZ	1979	Planta	144	p.149
PEPC-MDH-EM	MUKERJI	1968	Ind.J.Biochem.	5	p.62
	QUEIROZ	1968	Physiol.Vég.	6	p.117
	MOREL et col.	1972	Physiol.Vég.	10	p.743
AAT-AlaAT	MOREL	1973	Photopériodisme et CAM: rythmes circadiens d'activité enzymatiques et régulation.Thèse d'Etat. Paris VI.		

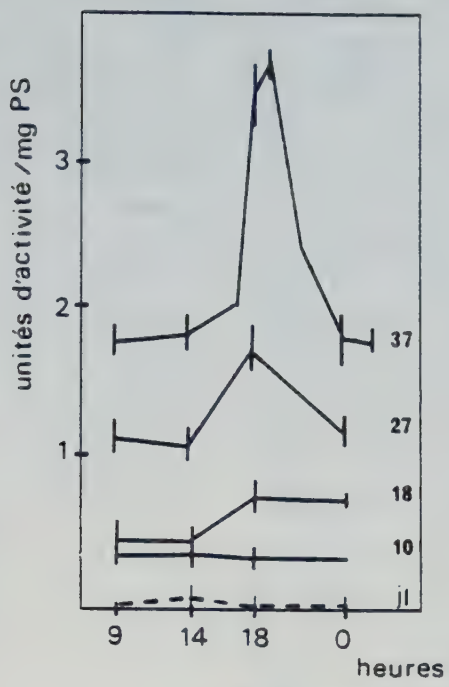


fig.1

Oscillations journalières de la capacité de la PEPC avec le nombre de Jours Courts. D'après QUEIROZ, fig.1, 1968.

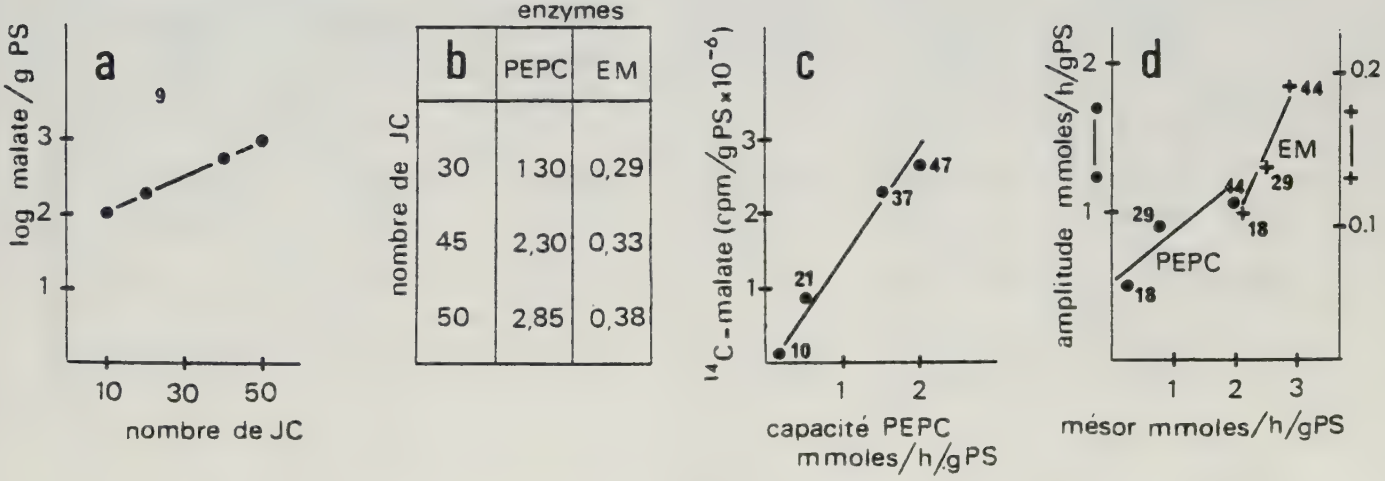


fig.2

2a : Effet du nombre de JC sur la variation du contenu en malate des feuilles de *Kalanchoe blossfeldiana*. D'après QUEIROZ et MOREL, fig.2, 1974a.

2b : Capacités enzymatiques maximales exprimées en mmoles/h/g PS, de la PEPC et de l'EM, en fonction du nombre de JC. D'après MOREL et coll., tableau I, 1972.

2c : Corrélation entre le ^{14}C-malate produit à partir de $^{14}CO_2$ et la capacité de la PEPC avec le nombre de JC (10, 21, 37 et 47). D'après QUEIROZ et MOREL, fig.7, 1974a.

2d : Relation entre l'amplitude et le mésor des oscillations des capacités de la PEPC et de l'EM avec le nombre de JC (18, 29, 44). D'après QUEIROZ et MOREL, fig.10, 1974a.

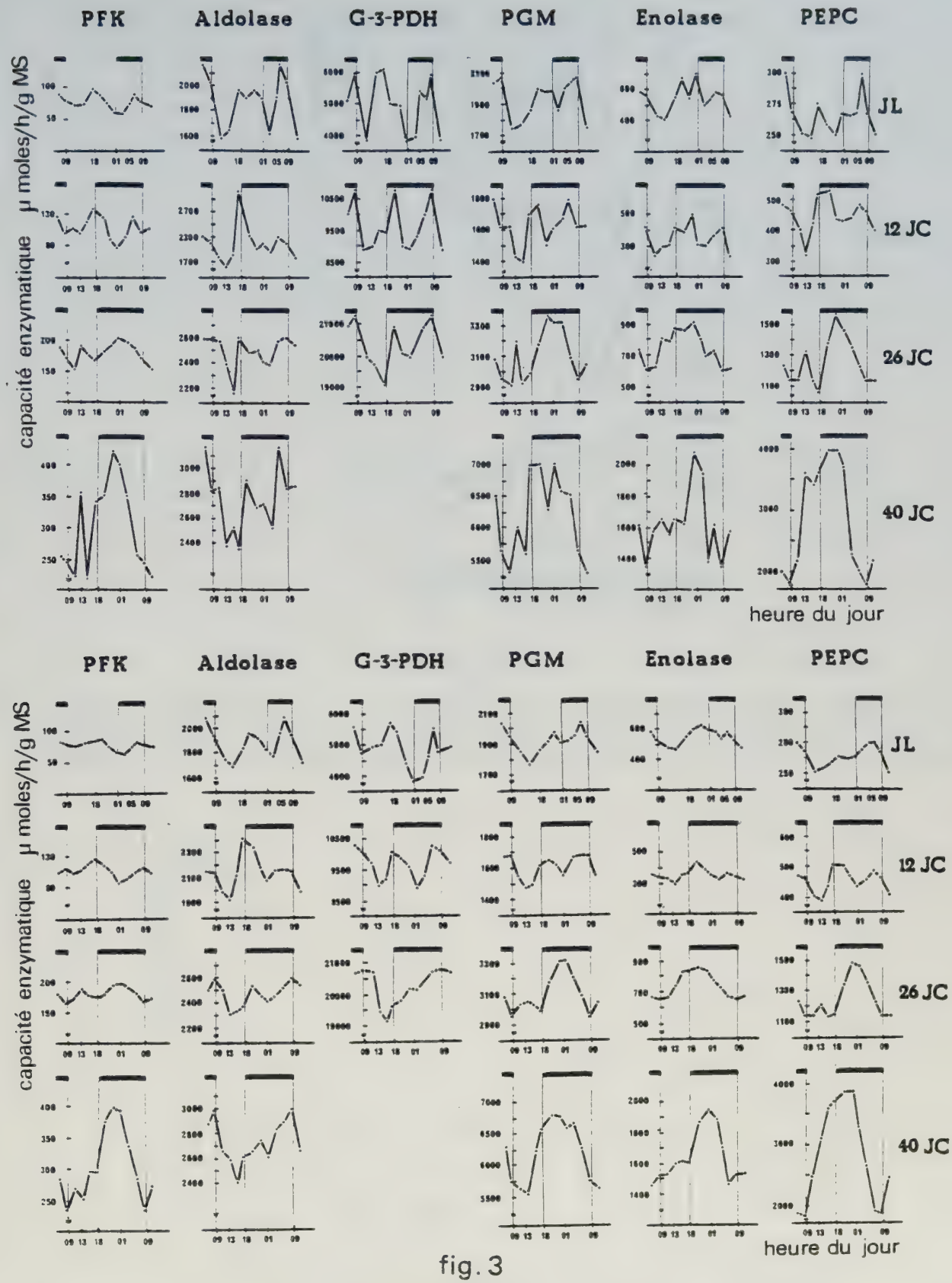


fig. 3

Rythmes journaliers de capacité de quelques enzymes de la glycolyse et de la PEPC en JL, et aux 12ème, 26ème, 40ème JC.

En haut : résultats expérimentaux. Le profil général des variations a été confirmé dans deux autres séries dont l'une sur 68 JC et par de nombreuses analyses ponctuelles pour les différentes enzymes.

En bas: courbes "lissées" par la méthode de la "moyenne flottante" sur trois points.

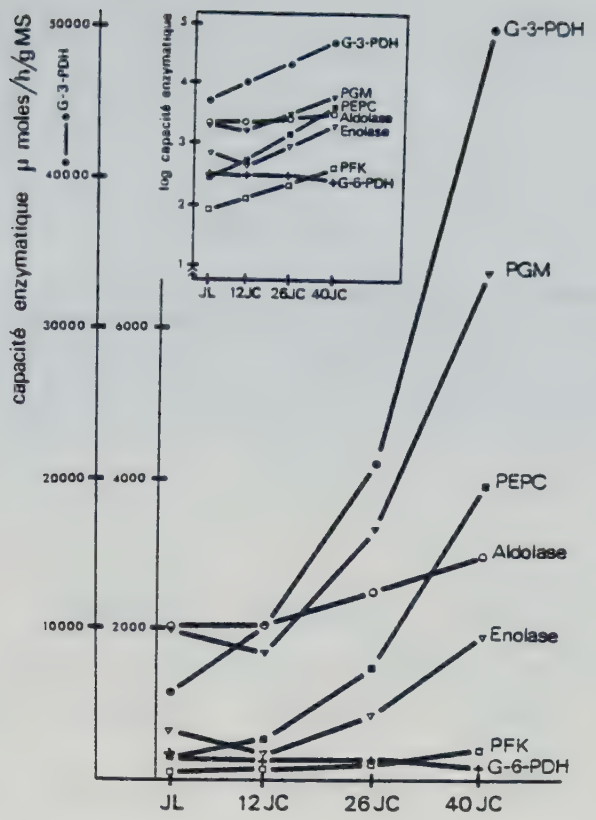


fig.4

Effet du nombre de JC sur les variations de capacité de quelques enzymes de la glycolyse, sur la PEPC et sur la G-6-PDH. (Les valeurs portées sont celles des maximums des oscillations journalières montrées dans la fig.3, courbe lissée).

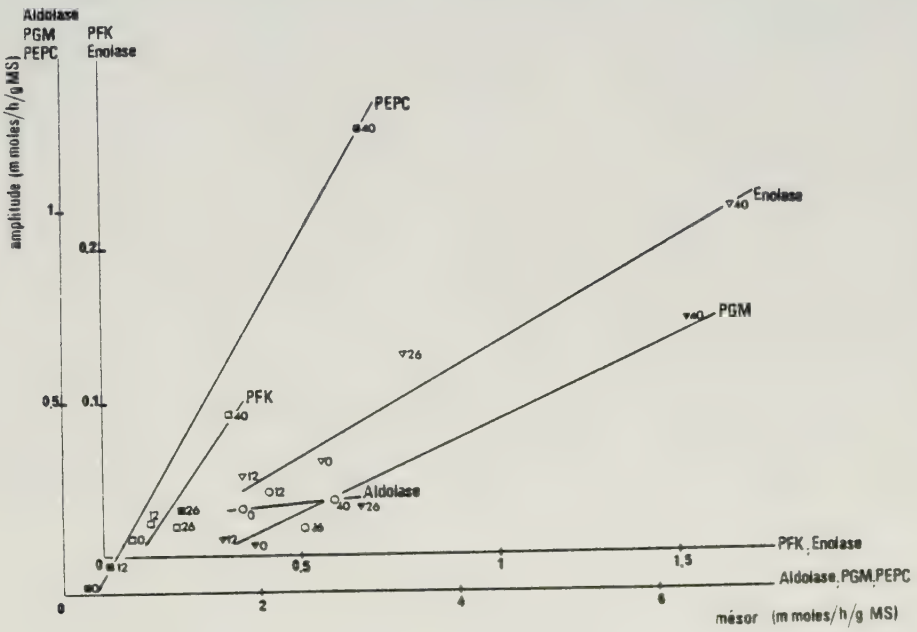


fig.5

Relation entre l'amplitude et le mésor des oscillations des différentes enzymes étudiées selon le nombre de Jours Courts. (Les valeurs portées sont celles obtenues après application de la méthode de calcul du Cosinor aux courbes montrées dans la fig.3, courbe expérimentale).

TABLEAU II

heures des maximum des oscillations journalières de capacité enzymatique en Jours Longs et en Jours Courts d'après les résultats de la figure 3. Les pics mesurés durant la période nocturne sont soulignés. Noter la transformation d'un rythme à 2 pics par 24 heures en un rythme à 1 pic par 24 heures avec le nombre de Jours Courts et le déphasage de 1'heure des maximum entre le 12ème et 26ème JC.

PHOTOPERIODE	PFK	Aldolase	G-3-PDH	PGM	Enolase	PEPC
JL	1900.0700	1900.0700	1800.0700	2200.0700	2200.0700	1900.0700
12 JC	1800.0900	1800.0700	1800.0700	2000.0700	2000.0700	1800.0700
26 JC	1300.0000	2000.0900	2200.0900	1300.0000	1500.2200	1300.0000
40 JC	0000	0900	-	0000	0000	0000

REGIME PHOTOPERIODIQUE		ENZYMES	DETECTION DU RYTHME : P	MESOR	AMPLITUDE	ACROPHASE en degrés	ACROPHASE en heures	
JL	12	PFK	< 0,045	76,3 ± 2,3	10 ± 6,1	-204° ± 39°	1848 ± 78 min	0648 ± 78 min
	12	Aldolase	> 0,05 (0,15) 2/	1814 ± 67	216 ± 179	-210° ± 52°	1900 ± 104 min	0700 ± 104 min
	12	G-3-PDH	> 0,05 (0,13) 2/	4698 ± 306	876 ± 816	-195° ± 53°	1830 ± 106 min	0630 ± 106 min
	12	PGM	< 0,05	1910 ± 28	123 ± 79	-222° ± 37°	1924 ± 74 min	0724 ± 74 min
	12	(Enolase) 1/	> 0,05 (0,46) 2/	(547 ± 30)	(59 ± 89)	(-244° ± 82°)	(2008 ± 164 min)	(0808 ± 164 min)
	12	PEPC	< 0,039	258 ± 4	17,8 ± 11	-171° ± 36°	1742 ± 72 min	0542 ± 72 min
12 JC	12	PFK	< 0,05	107 ± 4	20 ± 13	-191° ± 40°	1822 ± 80 min	0622 ± 80 min
	12	Aldolase	> 0,05 (0,13) 2/	2187 ± 84	271 ± 233	-190° ± 50°	1820 ± 100 min	0620 ± 100 min
	12	G-3-PDH	< 0,01	9714 ± 223	1265 ± 632	-227° ± 28°	1934 ± 56 min	0734 ± 56 min
	12	PGM	> 0,05 (0,06) 2/	1609 ± 33	135 ± 94	-217° ± 40°	1914 ± 80 min	0714 ± 80 min
	12	(Enolase) 1/	> 0,05 (0,37) 2/	(356 ± 23)	(51 ± 67)	(-248° ± 74°)	(2016 ± 158 min)	(0816 ± 158 min)
	12	PEPC	< 0,008	459 ± 12	76 ± 33	-206° ± 24°	1852 ± 48 min	0652 ± 48 min
26 JC	24	PFK	> 0,05 (0,10) 2/	183 ± 4	17 ± 13	- 4° ± 48°	0016 ± 192 min	
	12	Aldolase	> 0,05 (0,18) 2/	2466 ± 52	189 ± 151	-252° ± 52°	2024 ± 104 min	0824 ± 104 min
	12	G-3-PDH	> 0,05 (0,06) 2/	19965 ± 218	1013 ± 669	-257° ± 32°	2034 ± 64 min	0834 ± 64 min
	24	PGM	< 0,009	3097 ± 35	218 ± 98	-4,8° ± 26°	0019 ± 104 min	
	24	Enolase	< 0,007	762 ± 18	130 ± 52	-299° ± 11°	1957 ± 44 min	
	24	PEPC	< 0,02	1263 ± 40	209 ± 113	-4,5° ± 32°	0018 ± 128 min	
40 JC	24	PFK	< 0,044	314 ± 19	88 ± 53	-341° ± 37°	2248 ± 148 min	
	12	(Aldolase) 1/	> 0,05 (0,23) 2/	(2715 ± 86)	(231 ± 246)	(-243° ± 30°)	(2006 ± 60 min)	(0806 ± 60 min)
	24	PGM	> 0,05 (0,06) 2/	6289 ± 169	700 ± 463	-339° ± 40°	2239 ± 160 min	
	24	Enolase	> 0,05 (0,15) 2/	1670 ± 71	225 ± 195	-334° ± 52°	2220 ± 208 min	
	24	PEPC	< 0,001	3020 ± 128	1194 ± 361	-294° ± 18°	1937 ± 72 min	

TABLEAU III

1/ : Les enzymes dont le rythme n'est pas détecté sont indiquées entre parenthèse. 2/: Lorsque P est inférieur à 95 % les valeurs obtenues sont indiquées entre parenthèse.

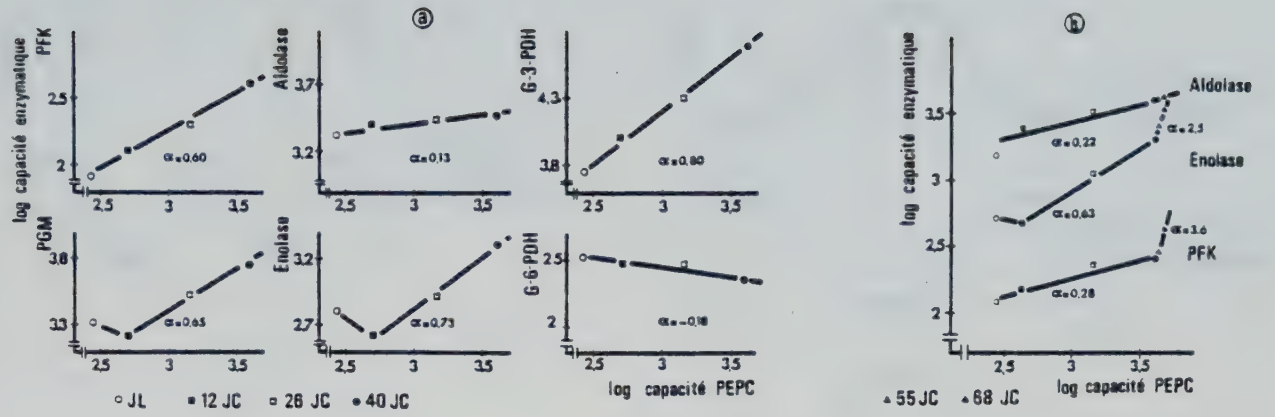


fig.6

6a. Relation d'allométrie entre la capacité de la PEPC et la capacité des enzymes de la glycolyse et la G-6-PDH. (Les valeurs portées pour chaque régime photopériodique sont les valeurs des maximums journaliers à partir des courbes de la fig.3, courbe lissée).

6b. Relation d'allométrie entre la capacité de la PEPC et la capacité de trois enzymes de la glycolyse (PFK, Aldolase, Enolase) dans une expérience où les mesures des oscillations journalières de capacité enzymatique ont été prolongées jusqu'au 68ème JC.

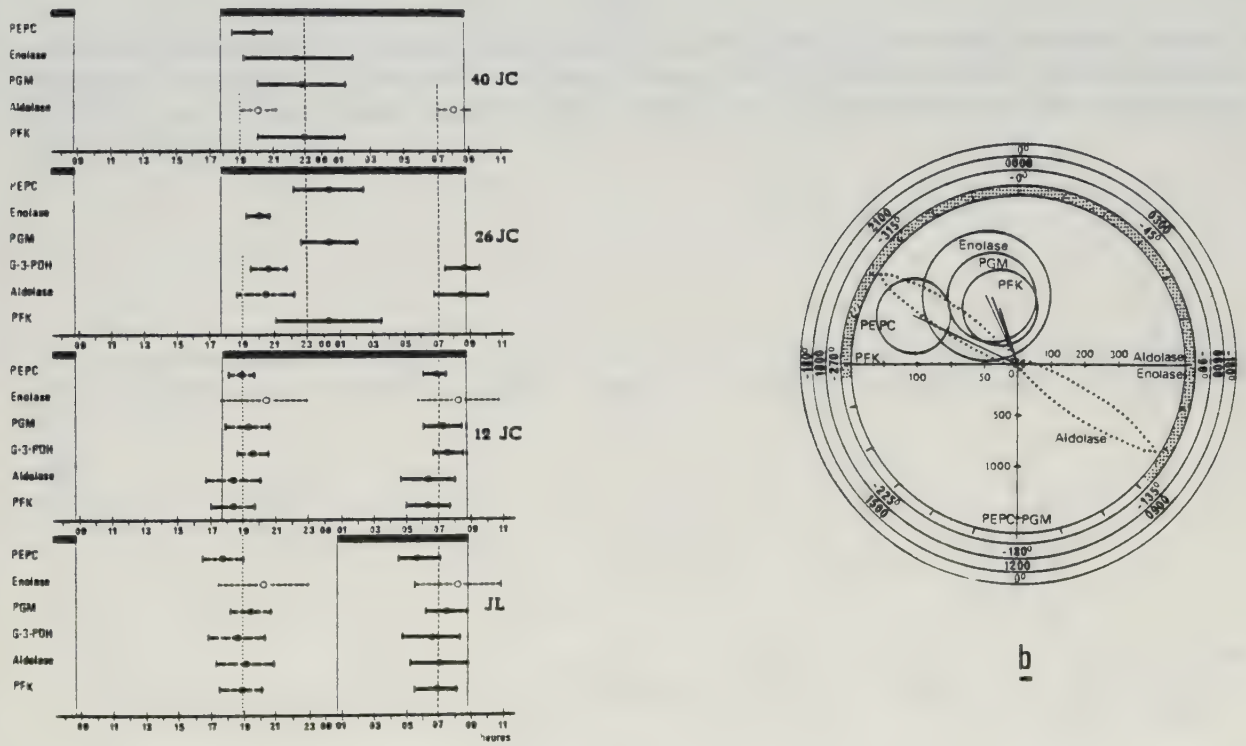


fig. 7

7a. Acrophases circadiennes avec leurs limites de confiance, pour une sécurité précisée dans le tableau III, des différentes enzymes de la glycolyse et de la PEPC. (——●—— acrophase nocturne, ---●--- acrophase diurne du double rythme en JL, ---○---acrophase des rythmes non détectés par le Cosinor),---------- heure moyenne des acrophases).

7b. Représentation en coordonnée polaire des rythmes de capacités enzymatiques au 40ème JC. Pour l'aldolase (double rythme de 12 heures) les ellipses recouvrent les pôles, le rythme de 12 heures n'est plus décelé par la méthode du Cosinor.

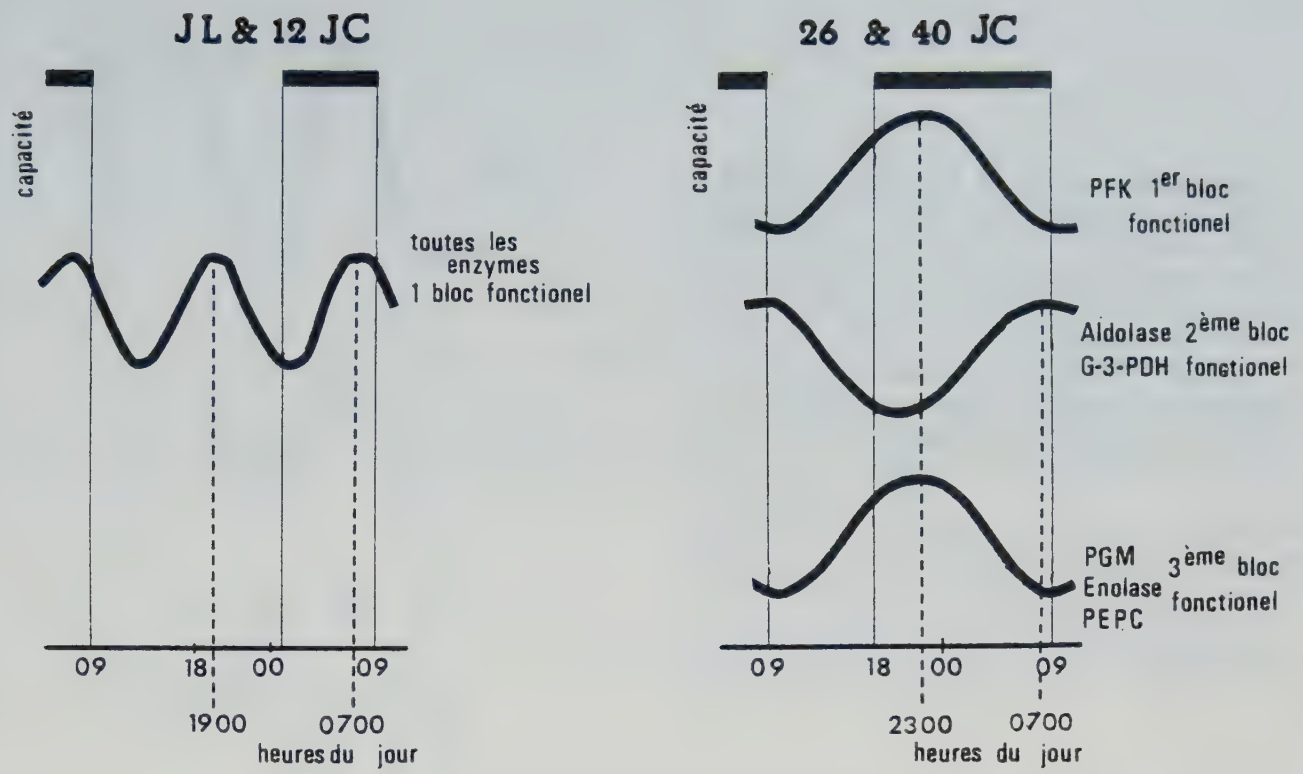


fig. 8

Relation de phase et blocs fonctionnels entre les différentes enzymes selon le stade de traitement photopériodique. Trace simplifiée ne tenant pas comte des différences d'amplitudes mais tenant compte de l'heure moyenne des acrophases de la fig.7a.

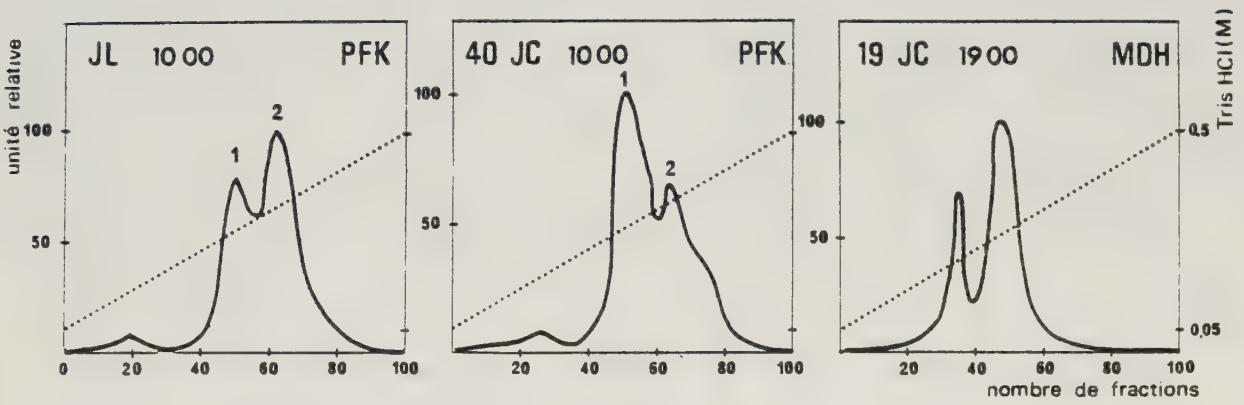


fig. 9

Profil d'élution sur DEAE-Sephacel de la PFK et la MDH après purification au $(NH_4)_2SO_4$ d'extraits de feuilles de JL et de JC. L'heure d'extraction est précisée.

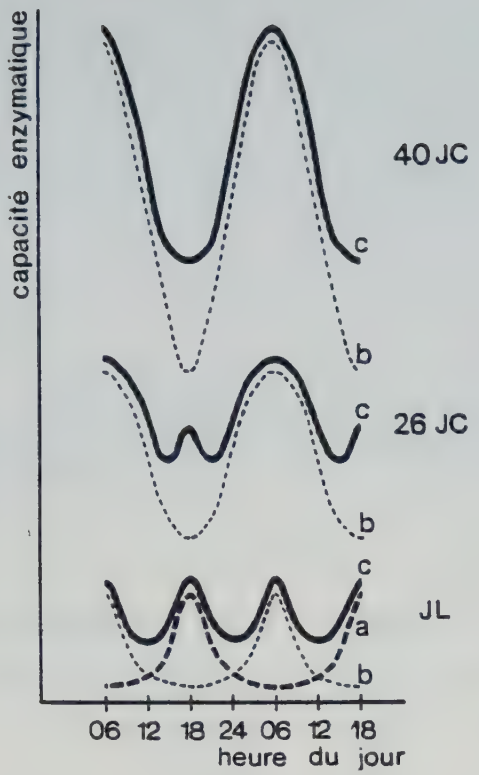


fig. 10

Modèle montrant la transformation progressive d'une oscillation à 2 pics par 24 heures (c en JL), résultant de la sommation de deux oscillations (a et b en JL) de 24 heures de période en opposition de phase, en une oscillation à 1 pic par 24 heures (c au 40ème JC).

Le modèle considère que le transfert de JL en JC augmente le niveau et l'amplitude de l'oscillation b sans modifier l'oscillation a.

Ce modèle rendrait compte de la relative symétrie des oscillations mesurées en JL et 12ème JC, la dissymétrie observée entre le pic de jour et le pic de nuit au 26ème JC, l'oscillation unimodale au 40ème JC (voir fig.3)

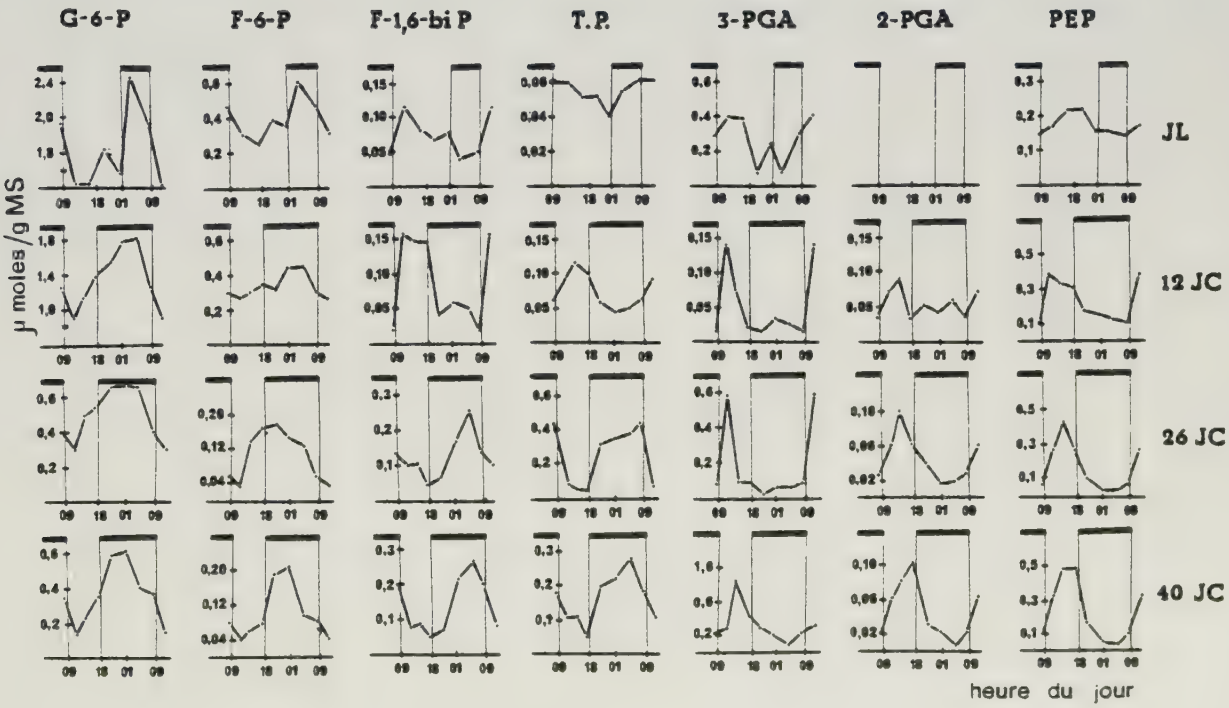


fig. 11

Rythmes journaliers de la concentration des intermédiaires de la glycolyse en JL et au 12ème, 26ème et 40ème JC

TABLEAU IV

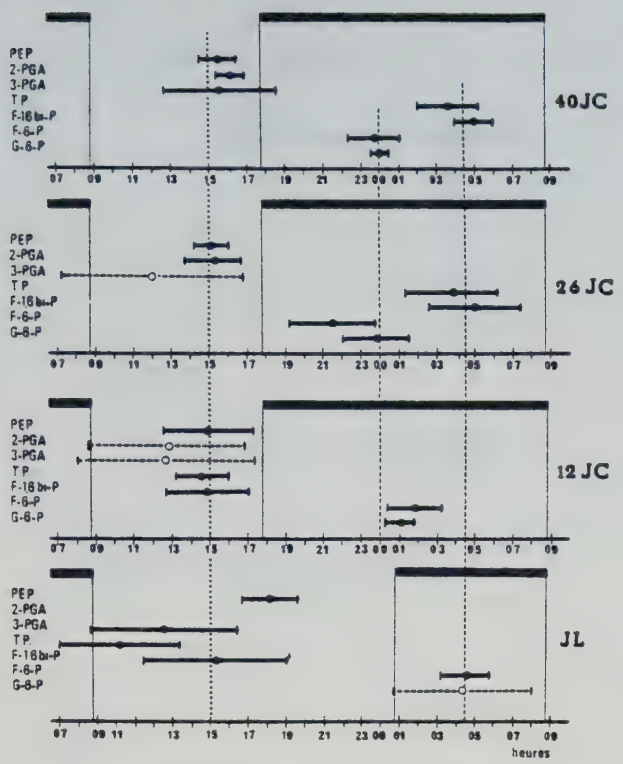
heure de maximum des oscillations circadiennes de la taille des pools de métabolites d'après les résultats de la figure 11. Les pics nocturnes sont soulignés.

PHOTOPERIODE	G-6-P	F-6-P	F-1,6-biP	T.P.	3-PGA	2-PGA	PEP
JL	0300	0300	1200	1200	1200	-	1500
12 JC	0500	0500	1200	1500	1200	1500	1200
26 JC	0100	2000	0500	0900	1200	1500	1500
40 JC	0100	0100	0500	0500	1200	1800	1800

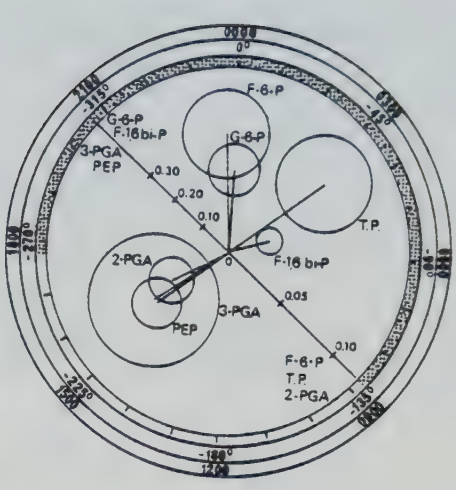
REGIME PHOTOPERIODIQUE		METABOLITES	DETECTION DU RYTHME : P	MESOR : M	AMPLITUDE : A	ACROPHASE : Ø en degrés	ACROPHASE : Ø en heures
	24	G-6-P	> 0,05 (0,29) [2]	1,63 ± 0,17	0,48 ± 0,50	- 65° ± 55°	0422 ± 220 min
	24	F-6-P	> 0,05 (0,15) [2]	0,40 ± 0,03	0,14 ± 0,10	- 66° ± 20°	0427 ± 80 min
JL	24	F-1,6-biP	> 0,05 (0,27) [2]	0,07 ± 0,008	0,025± 0,024	-229° ± 56°	1517 ± 224 min
	24	T.P.	> 0,05 (0,19) [2]	0,053± 0,002	0,016± 0,006	-150° ± 48°	1004 ± 192 min
	24	3-PGA	> 0,05 (0,26) [2]	0,25 ± 0,05	0,14 ± 0,13	-187° ± 58°	1232 ± 232 min
	24	PEP	< 0,04	0,17 ± 0,006	0,04 ± 0,01	-271° ± 22°	1807 ± 88 min
	24	G-6-P	< 0,02	1,46 ± 5,8	0,39 ± 0,17	- 15° ± 11°	0100 ± 44 min
	24	F-6-P	> 0,05 (0,14) [2]	0,35 ± 0,02	0,065± 0,054	- 26° ± 22°	0,148± 88 min
	24	F-1,6-biP	< 0,05	0,80 ± 0,14	0,66 ± 0,44	-222° ± 32°	1452 ± 128 min
12 JC	24	T.P.	< 0,005	0,072± 0,003	0,036± 0,011	-219° ± 16°	1436 ± 84 min
	24	(3-PGA) [1]	> 0,05 (0,36) [2]	(0,043± 0,0016)	(0,037± 0,047)	(-190° ± 70°)	(1241 ± 280 min)
	24	(2-PGA) [1]	> 0,05 (0,67) [2]	(0,057± 0,008)	(0,011± 0,023)	(-191° ± 61°)	(1248 ± 244 min)
	24	PEP	< 0,04	0,217± 0,023	0,143± 0,069	-224° ± 28°	1456 ± 142 min
	24	G-6-P	< 0,03	0,54 ± 0,02	0,17 ± 0,07	-356° ± 26°	2347 ± 104 min
	24	F-6-P	> 0,05 (0,07) [2]	0,126± 0,012	0,063± 0,035	-322° ± 34°	2128 ± 136 min
	24	F-1,6-biP	< 0,03	0,129± 0,014	0,086± 0,043	- 75° ± 26°	0501 ± 144 min
26 JC	24	T.P.	≤ 0,03	0,25 ± 0,03	0,19 ± 0,09	- 56° ± 26°	0346 ± 144 min
	24	(3-PGA) [1]	> 0,05 (0,41) [2]	0,124± 0,075	(0,157± 0,211)	-179° ± 76°	1158 ± 284 min
	24	2-PGA	< 0,02	0,043± 0,005	0,035± 0,015	-288° ± 22°	1513 ± 88 min
	24	PEP	< 0,02	0,164± 0,026	0,165± 0,078	-225° ± 13°	1504 ± 52 min
	24	G-6-P	< 0,003	0,39 ± 0,02	0,22 ± 0,05	-0,7° ± 14°	0003 ± 28 min
	24	F-6-P	< 0,01	0,115± 0,01	0,082± 0,028	-356° ± 20°	2344 ± 80 min
	24	F-1,6-biP	< 0,005	0,147± 0,011	0,112± 0,033	- 74° ± 16°	0458 ± 64 min
38 JC	24	T.P.	< 0,02	0,16 ± 0,01	0,08 ± 0,04	- 53° ± 24°	0334 ± 96 min
	24	3-PGA	> 0,05 (0,15) [2]	0,32 ± 0,07	0,24 ± 0,20	-234° ± 46°	1537 ± 184 min
	24	2-PGA	< 0,01	0,048± 0,006	0,042± 0,017	-242° ± 22°	1611 ± 44 min
	24	PEP	< 0,004	0,223± 0,02	0,242± 0,069	-233° ± 15°	1532 ± 60 min

TABLEAU V

[1] : Les métabolites dont le rythme n'est pas détecté sont indiqués entre parenthèse. [2] : Lorsque P est inférieur à 95 % les valeurs obtenues sont indiquées entre ( ).



a



b

fig.12

12a. Acrophases circadiennes avec leur limite de confiance, pour une sécurité précisée dans le tableau V des différents pools de métabolites de la glycolyse (---o---: rythme non détecté)

12b. Représentation en coordonnées polaires des rythmes de la taille des pools de métabolites au 40ème JC

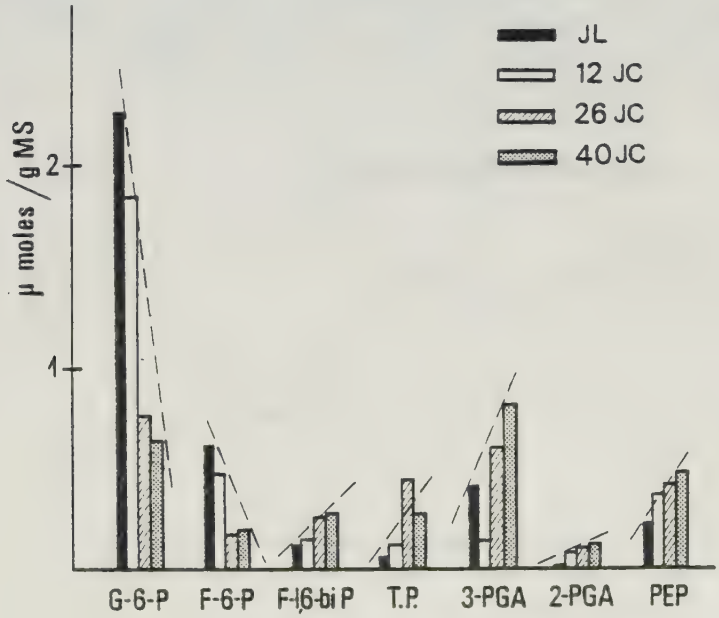


fig.13

Variations progressives de la taille des intermédiaires de la glycolyse après le transfert de JL en JC. (Les valeurs portées sont celles des maximums des oscillations journalières de la fig.11)

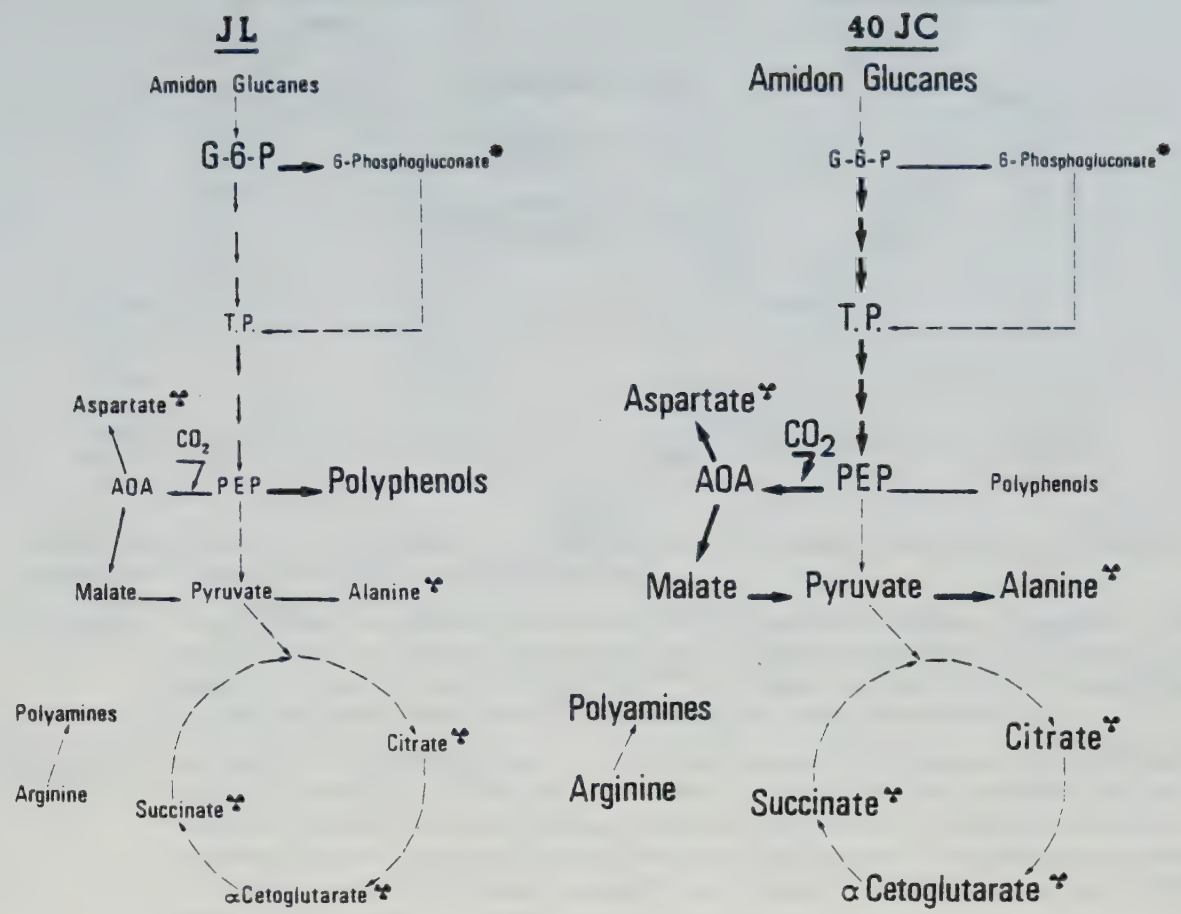


fig. 14

Coordination et balance de fonctionnement des différentes voies du réseau métabolique chez le *Kalanchoe blossfeldiana* selon le régime photopériodique. (⟶ : capacité faible, ➡ : capacité élevée; G6P et G-6-P : taille du pool de métabolite (avec ☢ obtenu par marquage), ⟶ enzymes non dosées, ✱ pool non dosé. (Cette figure rassemble les résultats obtenus par BALSA et coll., MOREL, DELEENS et PIERRE et QUEIROZ (voir texte)

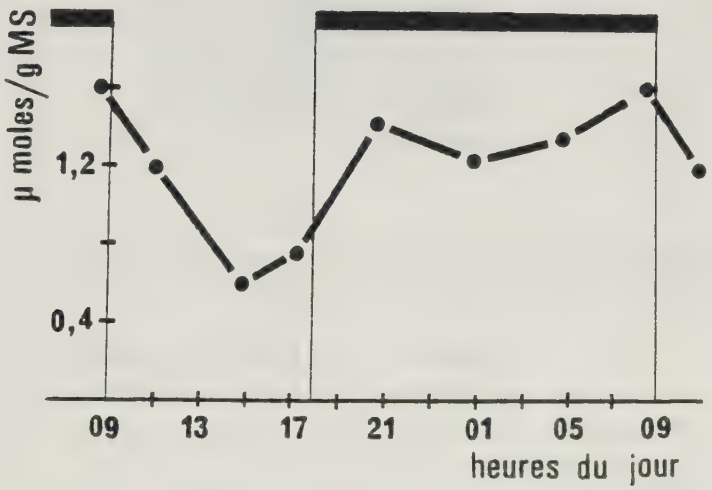


fig. 15

Variation journalière de la taille du pool de pyruvate au 40ème JC

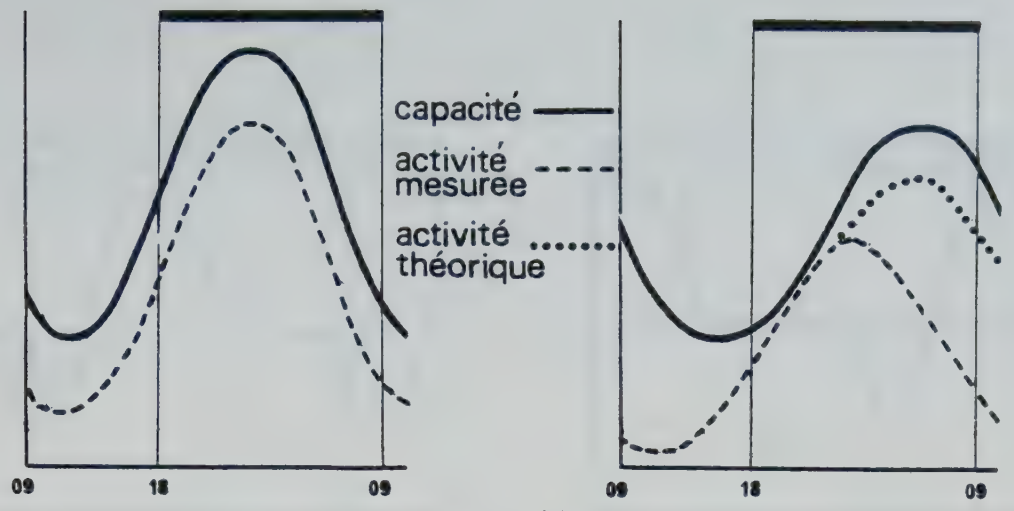


fig. 16

. Désynchronisation du rythme de capacité et du rythme d'activité. Courbes schématisées d'après QUEIROZ et MOREL 1974b.

A gauche : les rythmes de capacité et d'activité sont en phase. Exemple: capacité de la PEPC et activité mesurée par l'incorporation de ^{14}C dans le malate à partir de $^{14}CO_2$ au 51ème JC dans le *Kalanchoe blossfeldiana*, le malate est stocké dès sa production dans la vacuole.

A droite : Le pic d'activité précède le pic de capacité. Exemple : le *Kalanchoe blossfeldiana* au 70ème JC, la capacité maximum de stockage de la vacuole étant atteinte, toute nouvelle molécule de malate produite rétroinhibe sa propre fabrication, ce qui produit un déphasage entre l'activité effectivement mesurée et l'activité théorique sans phénomène de rétroinhibition.

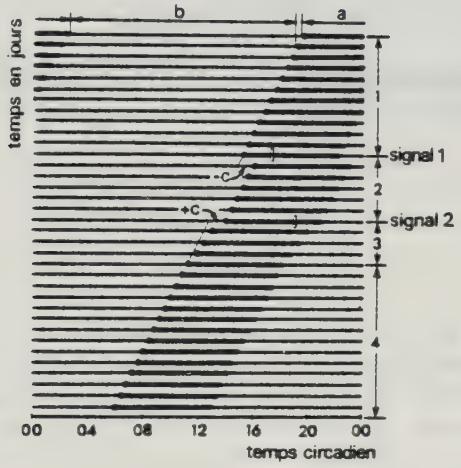


fig. 17

Déphasage du rythme d'activité nocturne d'une population de hamsters dorés (*Mesocricetus auratus*) par 2 brefs éclairements (15 min.). Retracé d'après DAAN et PITTENDRIGH (1976).

les ● représentent le début de l'activité nocturne.

les ——— représentent la durée de l'activité nocturne.

1 - les individus sont en condition d'obscurité continue $\tau = a + b$.

signal 1 - éclairement de 15 min., 2 heures après le début de l'activité

2 - retard de phase total immédiat ($\Delta\phi = - C \times \frac{24 \text{ heures}}{\tau}$), la population reprend le rythme de période τ dès le cycle de 24 heures suivant.

signal 2 - bref éclairement de 15 min., 5 heures après le début de l'activité soit 2 heures avant la fin de l'activité.

3 - avance de phase immédiate mais partielle avec transition de 4 cycles de 24 heures ou τ diffère pour chaque cycle. Après ces 4 cycles, $\Delta\Phi = + C \times \frac{24 \text{ heures}}{\tau}$

4 - la population a de nouveau un rythme d'activité de période τ.

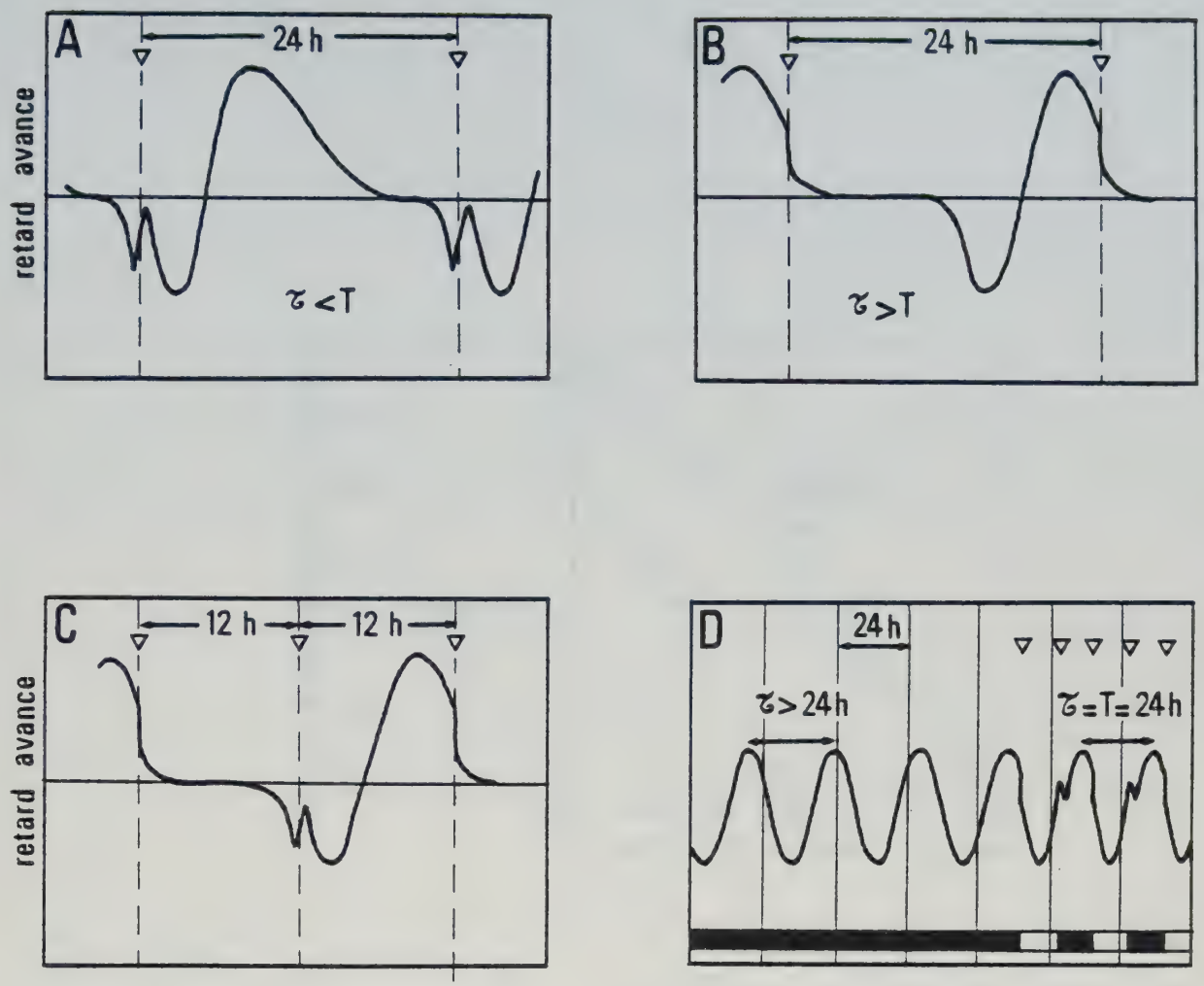


fig. 18

Fig.18. A, B, C. Modèle d'entraînement par des signaux périodiques d'un rythme circadien, oscillant à l'obscurité, d'après PITTENDRIGH et DAAN, 1976. Le rythme de période τ se stabilise en relation au Zeitgeber de période $T = 24$ heures lorsque le signal lumineux agit sur une phase de l'horloge caractérisée par une réponse de phase $\Delta\phi = \tau - T$. Pour un rythme ayant la courbe de réponse de phase montrée ici, si $\tau < T$ (fig.A) ou si $\tau > T$ (fig.B), l'entraînement par un seul signal périodique se fait en imprimant au rythme, respectivement, un retard ou une avance journaliers bien définis (avec un décalage correspondant de la courbe de réponse de phase), tels que les positions du maximum et du minimum du rythme vont rester fixes par rapport au signal. La figure C, correspondant à l'entraînement par 2 signaux ("photopériode squelettique"), montre l'effet d'entraînement que l'on peut attribuer aux signaux début de jour et début de nuit : l'horloge finit par s'équilibrer en une relation de phase avec le Zeitgeber telle que les effets correcteurs des 2 signaux aboutissent à un entraînement très stable. La figure D montre la transposition de cet effet sur un rythme passant de l'obscurité continue à des conditions photopériodiques (pour simplifier les cycles de réajustement ne sont pas montrés).

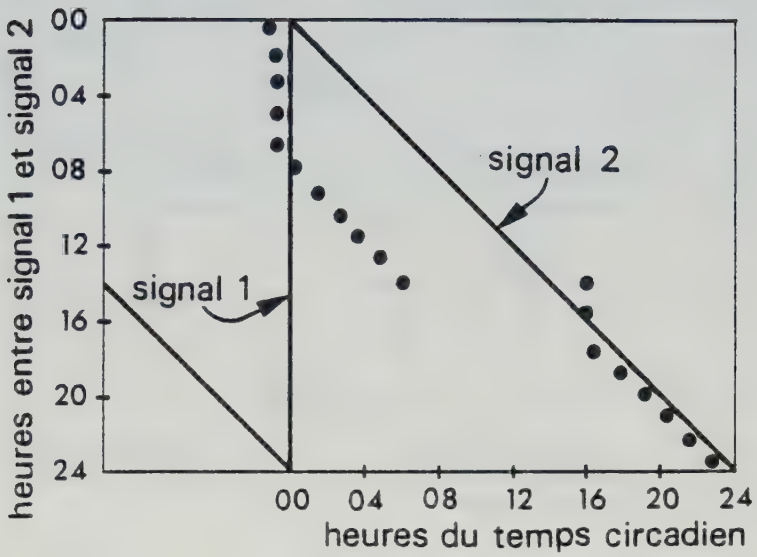


fig. 19

Acrophase (●) du rythme d'éclosion chez *Drosophila pseudoobscura* sous entraînement par des photopériodes squelettiques différentes. Retracé de PITTENDRIGH (1965).

Lorsque les signaux sont séparés de 8 heures au plus, l'acrophase reste relativement fixe (2300 du temps circadien) et coïncide avec le signal 1.
Lorsque les signaux sont séparés par un intervalle de temps allant de 9 heures à 14 heures les phases des rythmes d'éclosion sont différentes (pour un intervalle de 14 heures l'acrophase se situe à 0600 du temps circadien).
Entre 14 heures et 15 heures d'intervalle entre les deux signaux il y a un saut de phase dans le rythme d'éclosion (1600 du temps circadien).
Au delà de 15 heures d'intervalle, l'acrophase du rythme d'activité suit la position du signal 2.

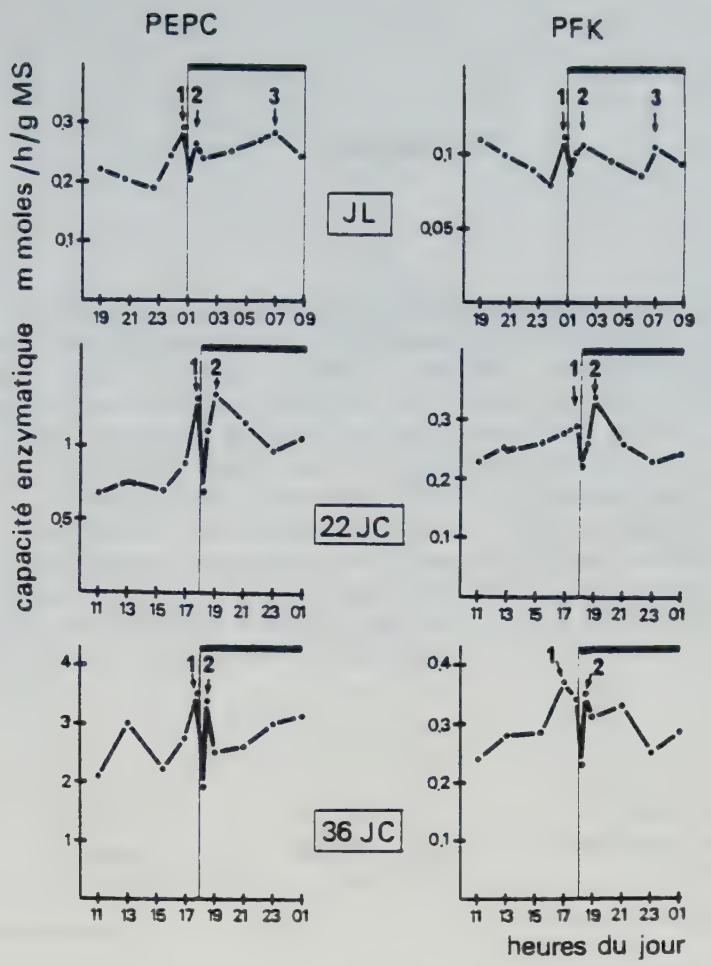


fig. 20

Modification de la capacité enzymatique de la PEPC et de la PFK avant et après le signal jour/nuit. (La régularité de la trajectoire rythmique est montrée (1300 au 26ème JC) pour 3 prélèvements effectués à 15 min. d'intervalle dans une "zone" éloignée du signal).

1 précède (sauf PEPC en JL) le signal.
2 se situe toujours après le signal.
3 acrophase du rythme de capacité enzymatique.

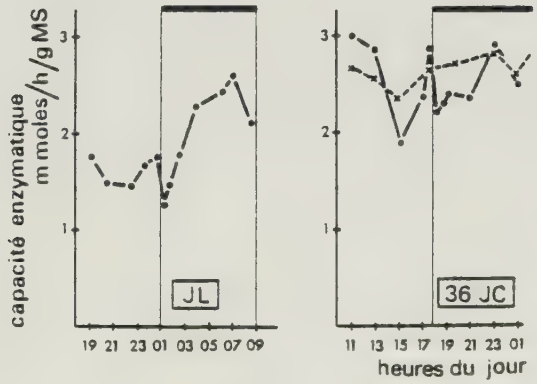


fig. 21

Modification de la capacité enzymatique avant et après le signal jour/nuit pour l'aldolase en JL et au 36ème JC. (Au 36ème JC, courbe en trait plein : courbe de réajustement, courbe en pointillés : rappel de la courbe de capacité au 40ème JC, fig.3).

TABLEAU VI

Après passage sur P_{60}, les protéines sont séparées des "petites molécules" dans des extraits provenant de prélèvements effectués à 1730 (15 min avant le signal) et à 1800 (15 min après le signal). Pour vérifier la possibilité de la présence d'activateurs ou d'inhibiteurs de faibles poids moléculaires on a mélangé les "petites molécules" de l'extrait de 1800 avec les protéines de l'extrait 1730 d'une part, et les "petites molécules" de l'extrait de 1730 avec les protéines de l'extrait 1800 ; d'autre part sur ces mélanges on a mesuré les capacités enzymatiques qui sont comparées aux valeurs des capacités enzymatiques obtenues avec les protéines seules. Les résultats obtenus ne permettent pas d'envisager un rôle activateur ou inhibiteur des "petites molécules" de PM < 2000, par contre la possibilité d'un effecteur de type polypeptide n'est pas à écarter.

PEPC	Extrait brut unité de 0.0	Extrait après P_{60} 0.0	P_{60} 1730 +"petites molécules" de 1800	% retrouvé
Extrait 1730	3,24	3,26	2,97	91 %
			P_{60} 1800 +"petites molécules" de 1730	
Extrait 1800	1,63	1,53	1,36	89 %

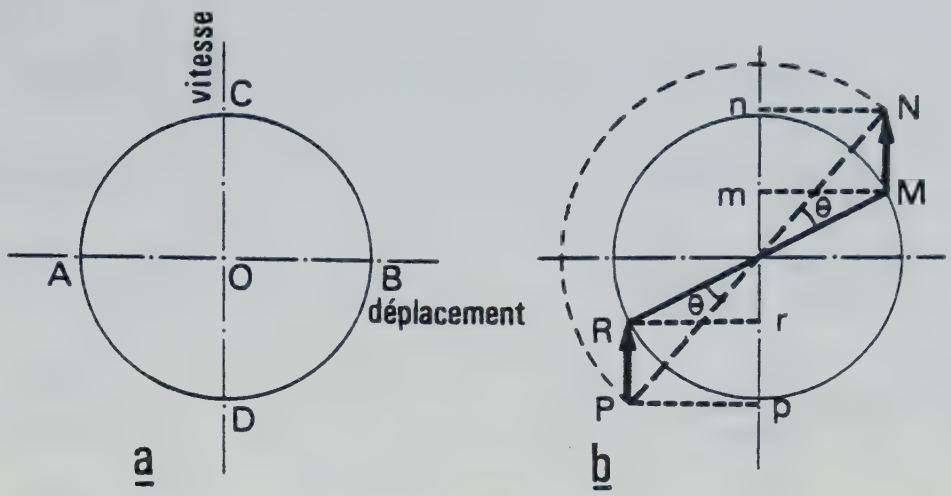


fig.22

A gauche : diagramme de phase d'un mouvement pendulaire : la vitesse s'annule pour les deux positions extrêmes du mouvement (A, B) et atteint le maximum (C, D) lorsque le pendule passe par la position d'équilibre.

A droite : Après une impulsion (dont la valeur est représentée par le vecteur MN donnée en M) dans le sens du déplacement, la vitesse s'accroît instantanément de m à n et l'amplitude du mouvement devient, plus grande (ON > OM) ; l'avance de phase est représentée par Θ . MN peut être assimilé à un réajustement de l'ancienne à la nouvelle trajectoire.

Une seconde impulsion de même intensité et de même direction PR donné en D réduira l'amplitude du mouvement et la vitesse avec un retard de phase Θ.

Pour assurer un entraînement stable (phase du rythme fixe) il suffit donc de deux signaux ayant des caractéristiques telles que, lorsqu'ils interviennent à des moments adéquats du cycle, leurs effets sur la phase se compensent , sans modifier les autres caractéristiques du rythme. Les résultats d'expériences faites à ce jour sur de nombreux organismes suggèrent que, en pratique, les "horloges" endogènes se rephasent par rapport à un nouveau régime de signaux jusqu'à ce que cette compensation soit atteinte. Ceci se traduit par des délais (temps de latence) avant le rétablissement d'une nouvelle stabilité d'entraînement. Ces délais varient selon les organismes, les conditions externes et les caractéristiques des signaux.

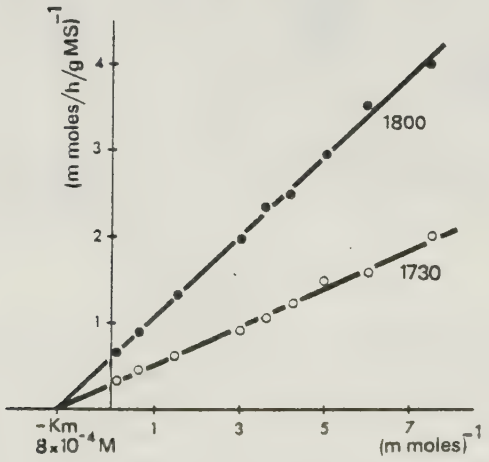


fig.23

Représentation selon LINEWEAVER et BURK de l'activité de la PEPC en fonction des concentrations en substrat (PEP) pour des extraits faits à 1730 et 1800

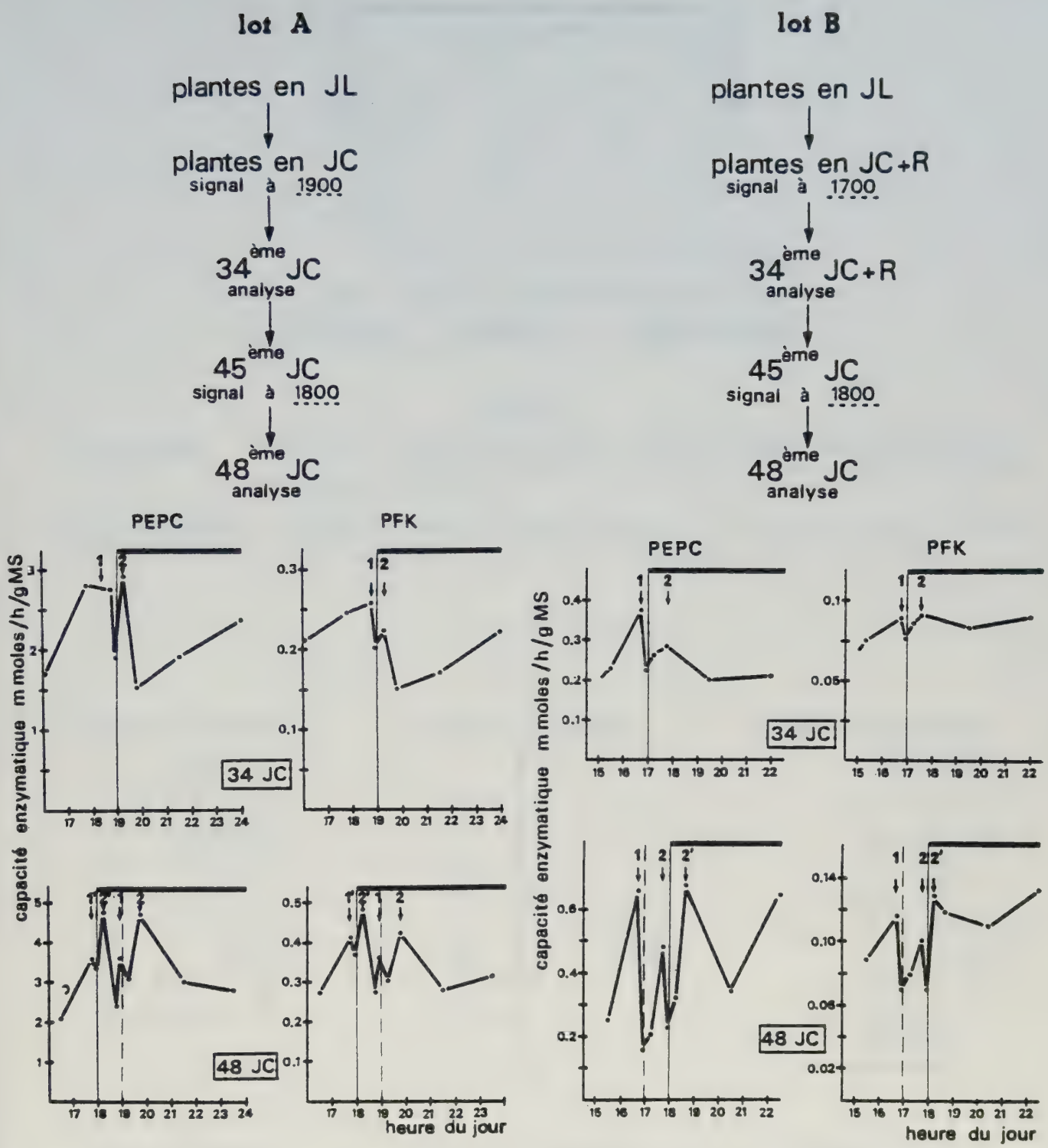


fig. 24

Protocole expérimental de l'étude de l'entraînement du rythme endogène de capacité enzymatique par une modification de la position du signal "début de nuit" dans le cycle de 24 heures ; dans le lot B, 1/2 heure de Rouge donné entre 0115 et 0145 (période de sensibilité du rythme endogène) supprime l'effet des JC sur le niveau de capacité enzymatique (comparer les niveaux PEPC et PFK au 34ème JC entre les lots A et B) et fixe l'acrophase du rythme à 0030 (BRULFERT et col., 1975) ; cette interruption de la nuit a été supprimée à partir du 45ème cycle, ce qui déclenche l'augmentation subséquente de la capacité enzymatique (effet de JC). Dans les résultats expérimentaux la position de l'ancien signal est figurée par un pointillé au 48ème JC.

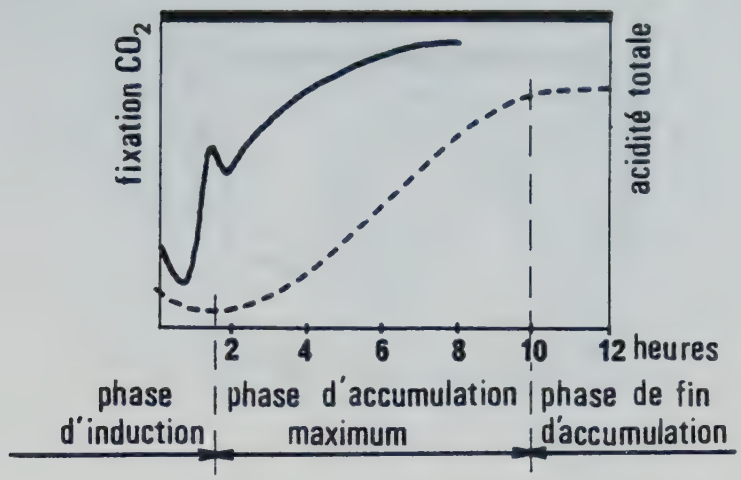
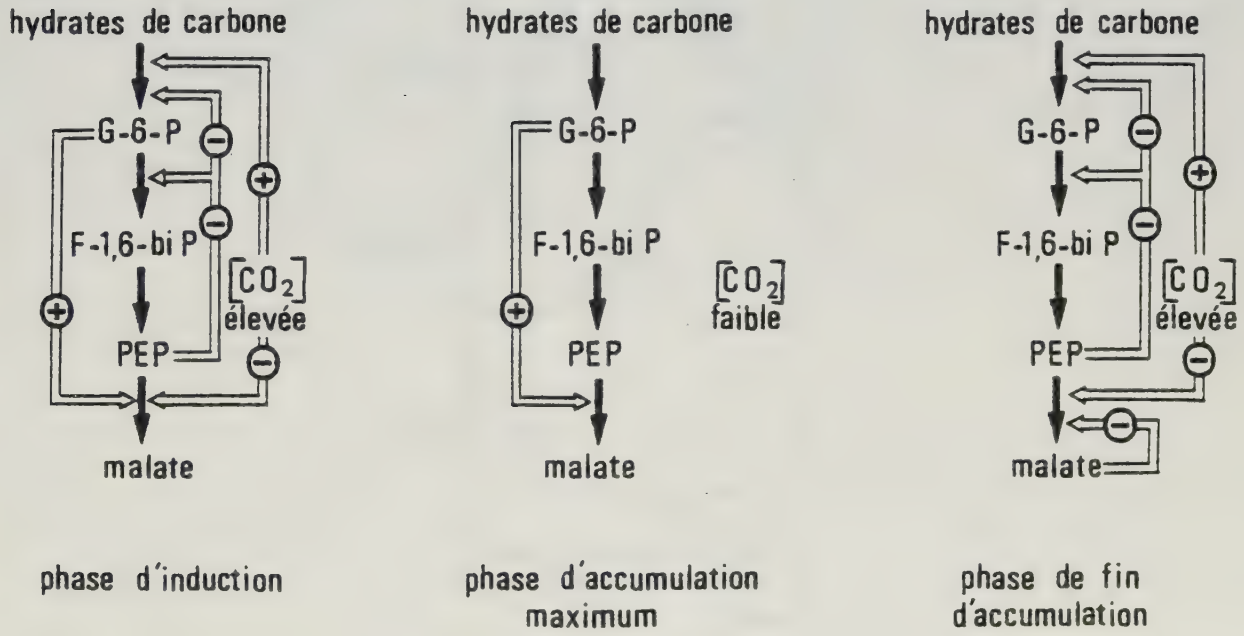


fig. 25

trait plein : courbe de fixation nocturne de CO_2 en régime photopériodique de JL, la période obscurité est de 08 heures. Retracé d'après MARCELLE (1975).

trait pointillé : courbe de dosage d'acidité totale, la période nocturne est de 12 heures. Retracé d'après COCKBURN et Mac AULAY (1977).



schema 3

Modèle selon COCKBURN et Mac AULAY, décrivant les mécanismes possibles de la régulation de l'accumulation nocturne de malate.

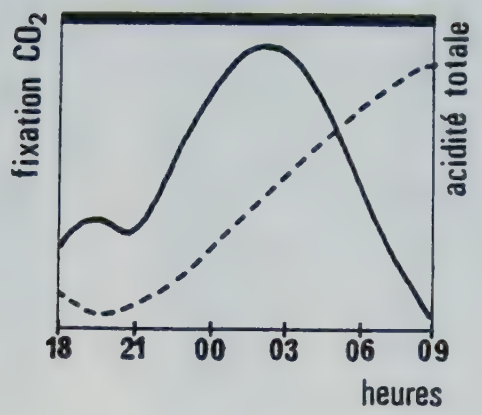


fig. 26

trait plein : courbe de fixation nocturne de CO_2 en JC. Retracé d'après QUEIROZ (1965).

trait pointillé : courbe d'accumulation nocturne de malate. Retracé d'après QUEIROZ et MOREL (1974 a).

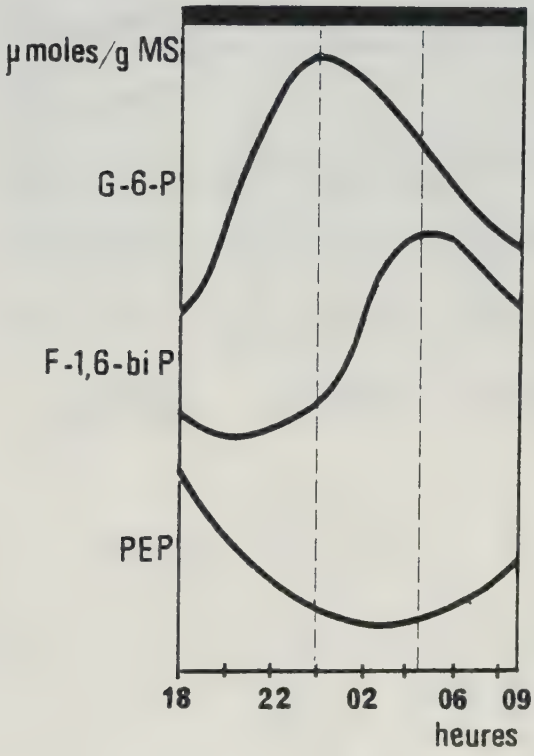


fig. 27

Représentation schématique au 40ème JC des oscillations de la taille des trois pools de métabolites de la glycolyse choisis par COCKBURN et Mac AULAY dans leur modèle. Courbes tirées de la fig.11 pour la situation du 40ème JC.

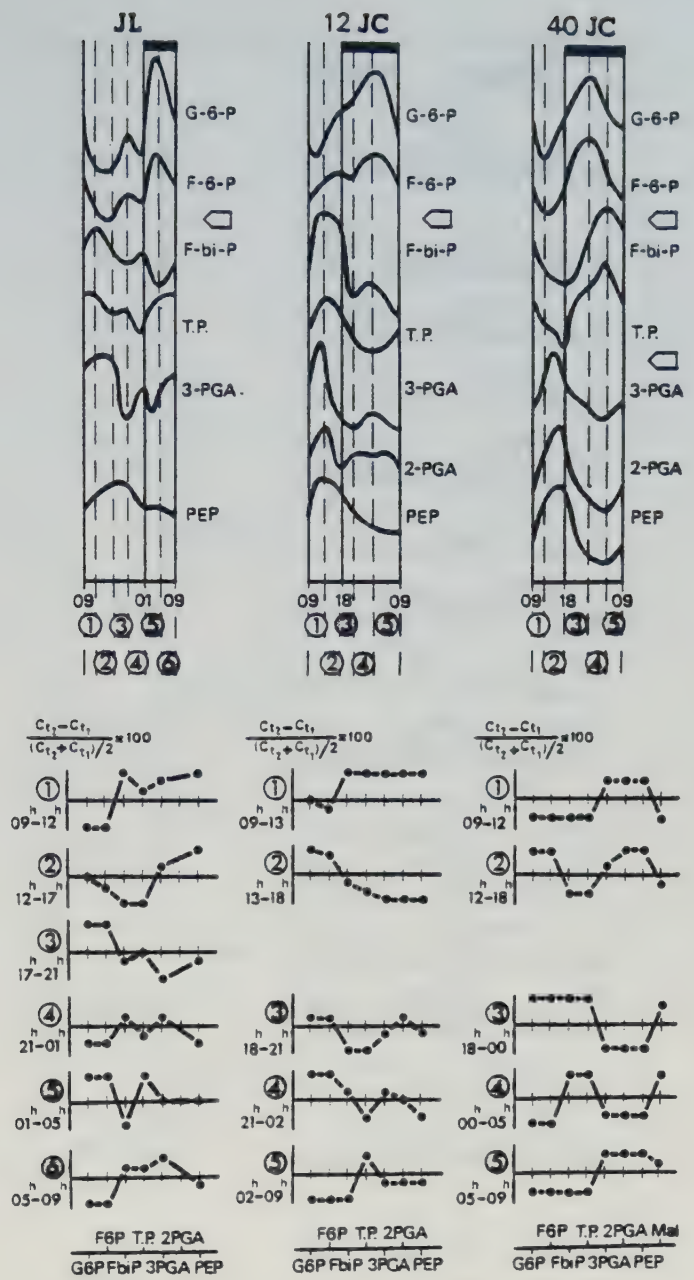


fig. 28

En haut : diagramme des variations journalières de la taille des pools de la glycolyse pour les situations de JL, 12ème et 40ème JC en accord avec les résultats obtenus dans la fig.11. (Les résultats pour le 26ème JC sont identiques à ceux du 40ème JC). Les flèches blanches indiquent les déphasages dans les rythmes; (1) , (2) , etc. indiquent des tranches horaires définies par le moment où le rythme de l'un quelconque des métabolites passe par un minimum ou un maximum.

En bas : Application du théorème du "crossover point" à l'analyse des variations des concentrations des intermédiaires de la glycolyse durant les intervalles de temps définis ci-dessus. Ct_1 et Ct_2 correspondent aux concentrations au début et à la fin de l'intervalle de temps. Pour un métabolite donné, l'expression $Ct_2 - Ct_1 / \frac{1}{2}(Ct_2 + Ct_1)$ est positive ou négative selon que le pool s'accroît ou décroît durant l'intervalle considéré. Les points de croisement indiquent les étapes de contrôle. Le pool de malate, au 40ème JC, est pris en considération pour montrer la régulation au niveau de l'étape PEPC.

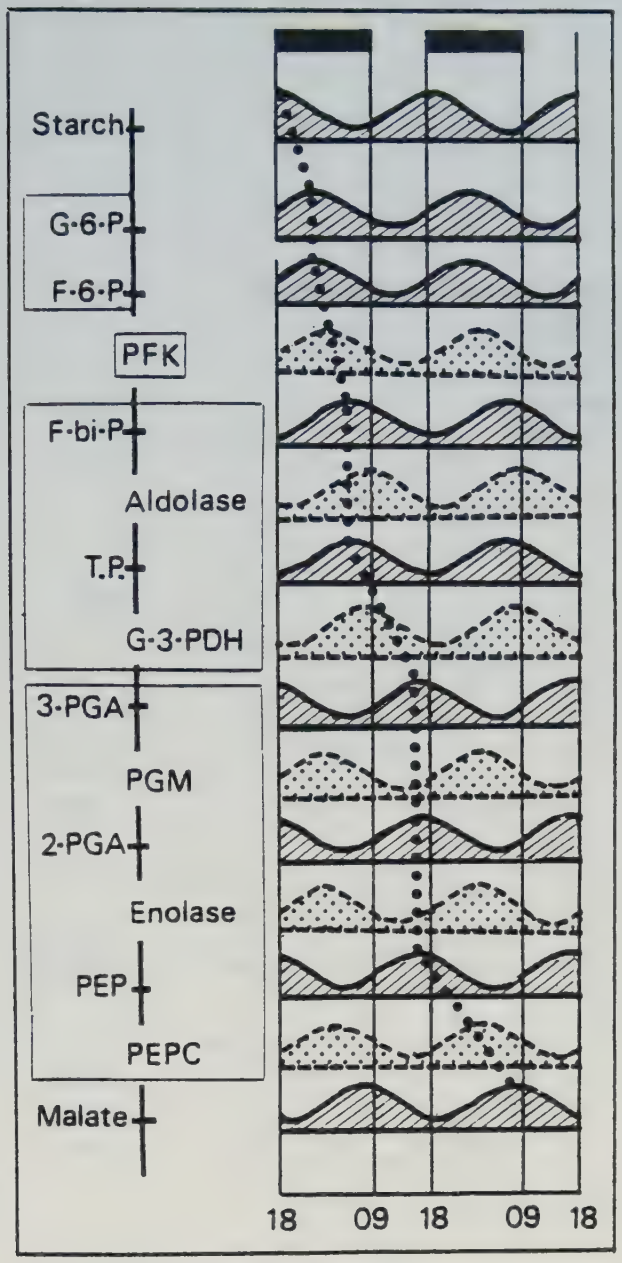


fig. 29

Schéma de l'organisation temporelle du fonctionnement de la voie de la glycolyse pour un niveau CAM élevé (40 JC). L'heure des maximums et minimums des rythmes des intermédiaires (traits pleins) et des capacités enzymatiques (traits pointillés) sont en accord avec les figures 3 et 11. Les données pour l'amidon et le malate viennent de KLUGE et coll. (1975) et de QUEIROZ et MOREL (1974a) respectivement. Les blocs indiquent les composantes métaboliques et enzymatiques oscillant respectivement en phases. G-6-P, F-6-P, PFK constituent le bloc 1 ; F-1,6-biP, T.P., Aldolase, G-3-PDH constituent le bloc 2 ; 3-PGA, 2-PGA, PEP, PGM, Enolase, PEPC constituent le bloc 3.

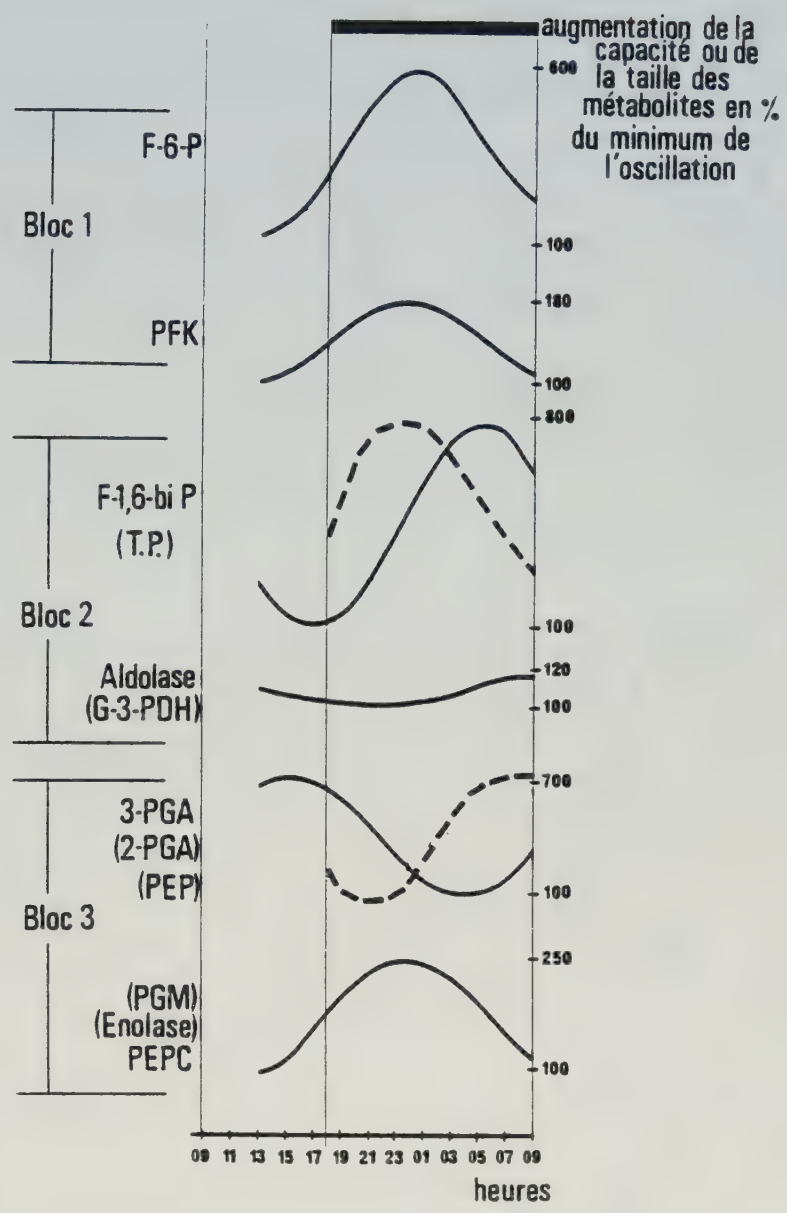
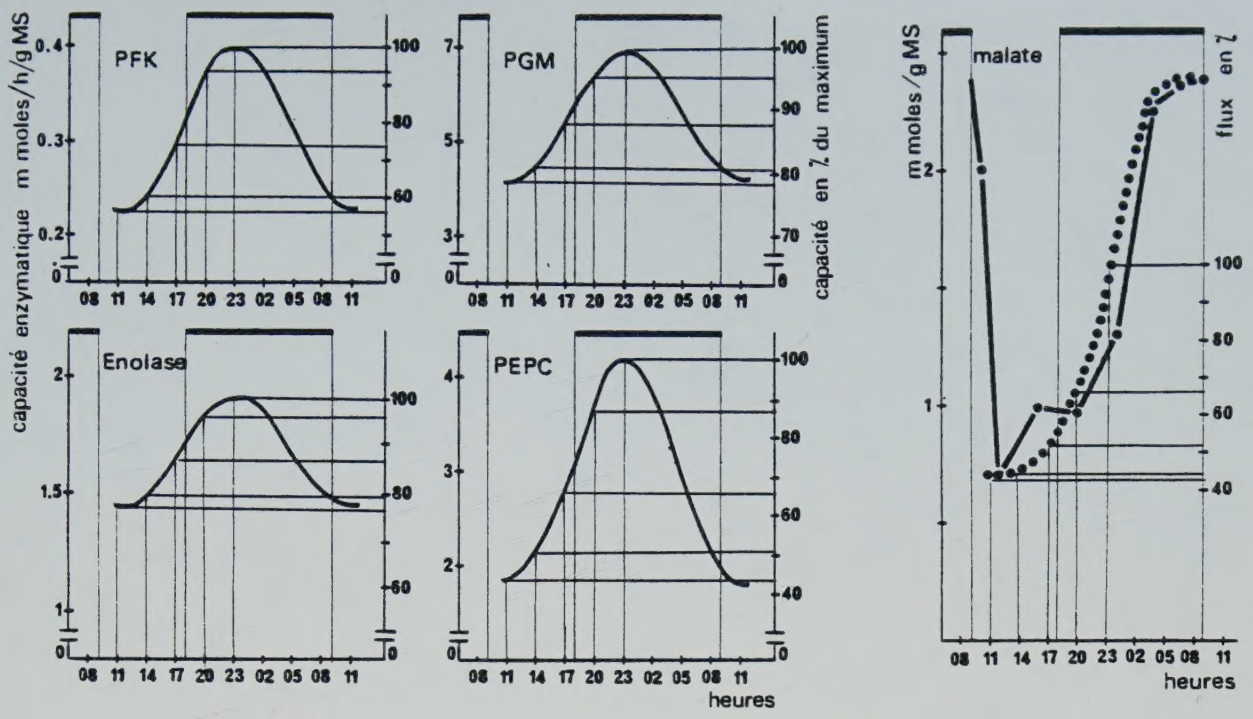


fig. 30

= Comparaison entre les variations journalières des pools d'intermédiaires de la glycolyse mesurées expérimentalement et celles déduites théoriquement des variations journalières de capacité enzymatique (traces schématiques, valeurs déduites des tableaux IV et V, 40ème JC).

traits pleins : résultats expérimentaux.
traits interrompus : résultats théoriques.



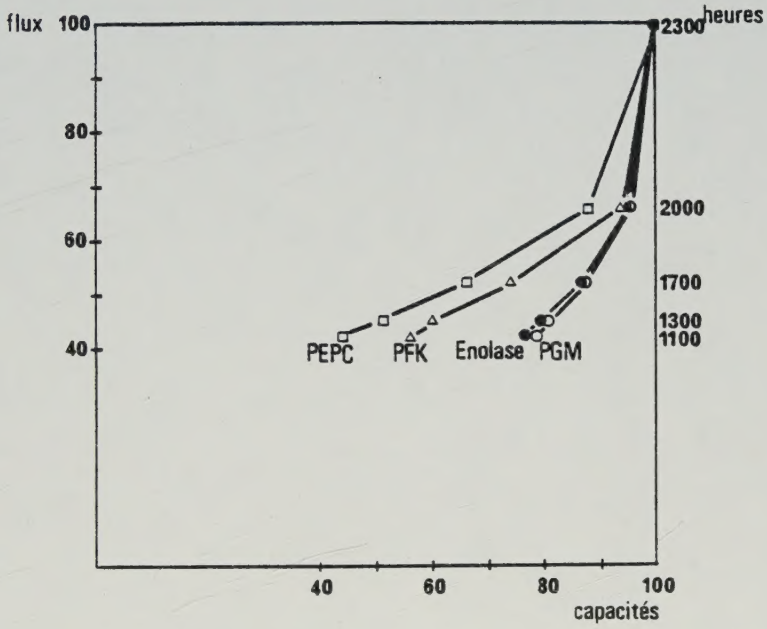
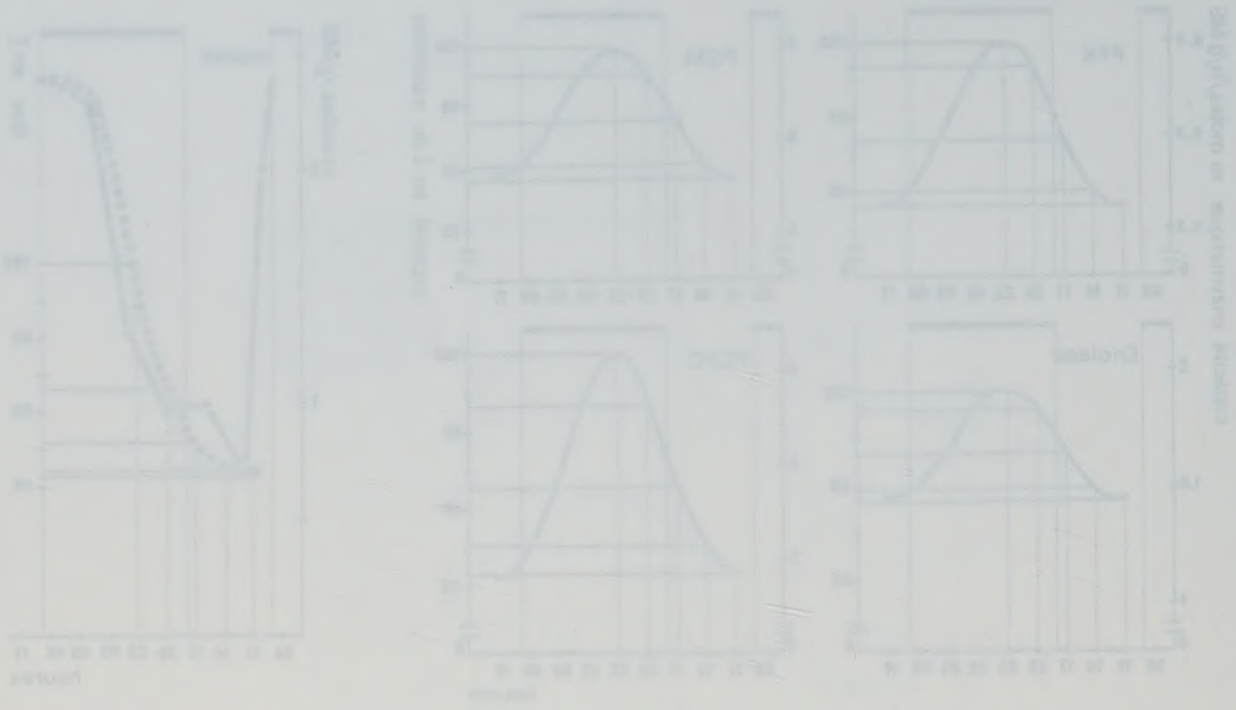
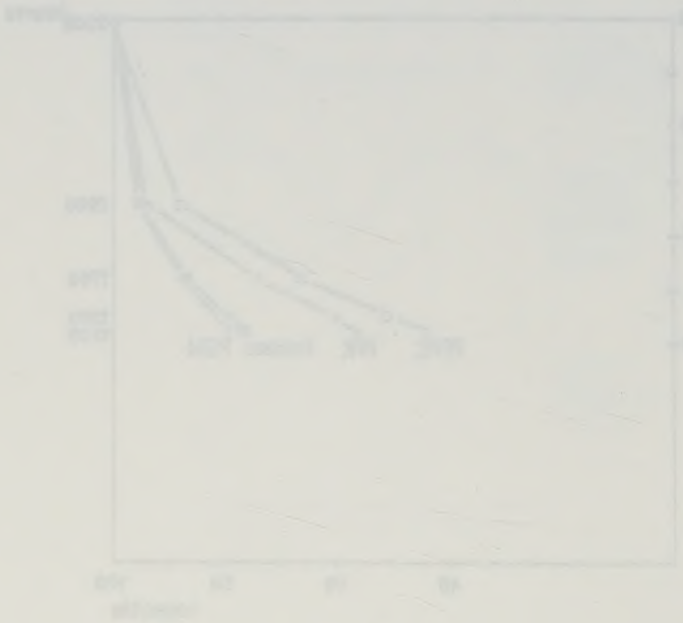


fig.31

- en haut à gauche : courbes d'oscillations circadiennes de capacité enzymatique tracées à l'aide des résultats obtenus par la méthode du Cosinor. L'acrophase des maximum a été fixée à 2300.
- en haut à droite : courbe expérimentale (trait plein) de l'accumulation nocturne du malate (D'après MOREL et coll., 1980). En pointillé, courbe théorique. 100 % du flux est donné par le point d'inflexion de la sigmoïde.
- en bas:relation entre les augmentations de flux et de capacité enzymatiques pour les intervalles de temps définis dans les courbes de variations du malate et des capacités enzymatiques.